



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT

Entzündungshemmende Effekte von ionisierenden Strahlung, untersucht in Co-Kultur Systemen humaner Endothelzellen und Leukozyten

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt

zur

Erlangung des akademischen Grades

eines Doctor rerum naturalium

genehmigte Dissertation von

Dipl. Ing. (FH) Jonas Martin Alwin Klinger

aus Frankfurt am Main

Berichterstatter (1. Referent):	Prof. Dr. Gerhard Thiel
Mitberichterstatter (2. Referent):	Prof. Dr. Marco Durante
Tag der Einreichung:	02.03.2012
Tag der mündlichen Prüfung:	23.04.2012

Darmstadt 2012

D17

Für meine geliebte Frau Sonja,
unser kleines Knöpfchen
und
meine Eltern

Danksagung

Die hier vorliegende Dissertation wurde im Zeitraum vom Dezember 2008 bis Februar 2012 in der Abteilung Biophysik des Helmholtzzentrums für Schwerionenforschung (GSI) in Darmstadt-Wixhausen angefertigt. Ich wurde in meiner Arbeit finanziell unterstützt durch ein Stipendium der *Helmholtz Graduate School for Hadron and Ion Research*. An dieser Stelle möchte ich mich zunächst bei all denjenigen Menschen bedanken, die mich während meiner Arbeit hilfreich unterstützt haben.

Mein erster Dank geht an den Leiter der Abteilung Biophysik Prof. Dr. Marco Durante für die Möglichkeit meine Arbeit an der GSI durchführen zu können sowie für seine Bereitschaft zur Übernahme des Co-Referats. Ich danke außerdem Prof. Dr. Gerhard Thiel, Prof. Dr. Paul Layer sowie Prof. Dr. Gerhard Kraft für ihre Bereitschaft diese Doktorarbeit als Referent bzw. Co-Referenten zu betreuen. Bei Herrn Prof. Dr. Durante und Herrn Prof. Dr. Thiel möchte ich mich außerdem für ihre Unterstützung durch die nützlichen Anregungen und Diskussionen im Laufe dieser Arbeit bedanken.

In ganz besonderer Weise möchte ich meiner Betreuerin an der GSI Frau Dr. Claudia Fournier danken. Sie hat mit ihrer fachlich kompetenten Betreuung in entscheidendem Maße zum Erfolg dieses Projekts beigetragen. Die vielen nützlichen Diskussionen sowie ihr großer Erfahrungsschatz in der Organisation einer wissenschaftlichen Arbeit haben mir sehr bei der Umsetzung meines Vorhabens geholfen. Auch sehr dankbar bin ich ihr für die vielen Anregungen sowie die konstruktive Kritik, die mir im Laufe meiner Arbeit stets weitergeholfen haben, aufkommende Schwierigkeiten gut zu bewältigen.

Ein herzlicher Dank geht auch an die von mir mit betreuten Diplomandinnen und Bachelor-Studenten/-innen Sophie Richter, Aljona Groo, Joana Zink sowie Falko Reis, die mich vor allem bei sehr aufwändigen Experimenten stets hilfreich unterstützt haben. Auch meinen weiteren Kollegen in der Arbeitsgruppe „Langzeit-Effekte“ von Frau Dr. Fournier möchte ich meinen Dank aussprechen. Hier wären zu nennen: Dr. Daniela Kraft, Dr. Sebastian Zahnreich, Dr. Palmina Simoniello, Till Dettmering, Susanne Ullrich, Alessia Ferrara, Shara Jamal, Alexandra Eilert sowie Jan Knoop. Vielen Dank für die angenehme Arbeitsatmosphäre und eure Unterstützung. Frau Dr. Sylvia Ritter und Frau Petra Hessel danke ich für ihre hervorragende Organisation des Laboralltags, so dass ich stets in einem gut eingerichteten Labor arbeiten konnte. Dr. Michael Scholz, Dr. Thomas Friedrich, Herrn Wolfgang Becher sowie Herrn Günther Lenz danke ich für die Organisation der Strahlzeiten und den reibungslosen technischen Ablauf am Bestrahlungsplatz. Des Weiteren möchte ich mich noch bei Herrn Rayees Khan für seine Unterstützung in der technischen Planung der im Rahmen dieser Arbeit etablierten *Flow Chamber* bedanken.

Außerdem gilt mein Dank dem Forschungsinstitut Bad Gastein (FOI) sowie dessen Leiterin Dr. Angelika Moder für die Teilfinanzierung meiner Forschungsarbeit sowie für die Möglichkeit Untersuchungen an Patienten im Bad Gasteiner Heilstollen durchführen zu können.

Zusammenfassung

Die Therapie von chronisch-entzündlichen Erkrankungen wie z.B. Morbus Bechterew mit niedrig dosierter, ionisierender Strahlung (α -Strahlung, Photonen) wird bereits seit mehreren Jahrzehnten erfolgreich angewendet. Die molekularen und zellulären Mechanismen, die diesem Effekt zugrunde liegen, sind jedoch bis jetzt nicht verstanden. Ziel dieser Arbeit war es, entzündungsrelevante und vor allem inhibierende Effekte von ionisierender Strahlung auf zellulärer und molekularer Ebene zu untersuchen. Da die lokale Dosis-Deposition bei dicht-ionisierender Strahlung nicht homogen erfolgt, wurde dünn- und dicht-ionisierende Strahlung insbesondere im Niedrig-Dosis-Bereich (0,1-1Gy) miteinander verglichen. Hierbei wurden zum einen Röntgenstrahlung und zum anderen beschleunigte Ionen verwendet.

Für die durchgeführten Experimente wurden verschiedene Zelltypen verwendet, die in Entzündungsprozesse involviert sind und somit potenziell an der Entzündungshemmung beteiligt sein könnten. Hierbei wurden in Gefäßzellen (Endothelzellen) sowie in Zellen des Immunsystems (Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen) folgende biologische Endpunkte untersucht: Induktion von Apoptose, phagozytotische Aktivität von Makrophagen in Co-Kultur mit apoptotischen Lymphozyten, Adhäsion von Lymphozyten an Endothelzellen sowie die Freisetzung von Zytokinen in Gefäß- und Immunzellen. Die Induktion von Apoptose wurde hierbei im Zusammenhang mit einer möglichen entzündungshemmenden Wirkung apoptotischer Zellen auf Phagozyten untersucht. Entzündungsprozesse werden unter anderem über die Adhäsion von Immunzellen an der Endothelzellschicht der Blutgefäße und nachfolgender Transmigration ins Gewebe reguliert. Dieser Prozess ist damit ein potentieller Indikator für die entzündungshemmende Wirkung der Niedrig-Dosis-Bestrahlung. Die hier präsentierten Untersuchungen wurden vor allem in humanen Primärzellen durchgeführt, deren Differenzierung in Funktionszellen *in vitro* teilweise erst etabliert werden musste. Um in Zellversuchen der Situation im Organismus möglichst nahe zu kommen, wurden auch zwei verschiedene Co-Kultursysteme etabliert sowie ein technischer Aufbau zur Imitation des Blutstroms entwickelt. Erste Experimente zum Vergleich der Effekte in Blutproben von Radontherapie-Patienten wurden ebenfalls durchgeführt.

Bei der Suche nach möglichen Zielzellen der Bestrahlung, die mit Apoptose auf die Exposition reagieren, erwiesen sich periphere Blutlymphozyten als besonders sensitiv, dicht-ionisierende ist wirksamer als dünn-ionisierende Strahlung. Weder Endothelzellen noch Makrophagen zeigten deutlich strahleninduzierte Apoptose. In Blutzellen von Patienten, die sich einer Radonkur unterzogen haben, wurde zwar ein Trend zu einer entsprechenden Zunahme apoptotischer Lymphozyten nach mehreren Anwendungen beobachtet, dieser ist jedoch statistisch nicht signifikant.

In Co-Kulturversuchen mit Primärzellen wurde deutlich, dass sich die Induktion von Apoptose in Lymphozyten durch ionisierende Strahlung stimulierend auf die phagozytotische Aktivität von Mak-

rophagen auswirkt, und zwar insbesondere auf den M-CSF Subtyp, der in entzündungshemmenden Prozessen eine Rolle spielt. Allerdings war die Steigerung der phagozytotischen Aktivität von der Dosis, mit der die Lymphozyten bestrahlt worden waren, und damit von der Zahl der vorhandenen apoptotischen Zellen abhängig. Er war sowohl mit Röntgenstrahlung als auch mit Kohlenstoffionen nachweisbar. Es konnte jedoch nicht abschließend geklärt werden, ob es durch die Steigerung der phagozytotischen Aktivität in der Co-Kultur zu einer veränderten Freisetzung entzündungshemmender Zytokine kommt, wie dies im Zusammenhang mit der Regulation von Entzündungsprozessen diskutiert wird. Die Freisetzung der untersuchten Zytokine TNF- α und TGF- β wies nur geringfügige Veränderungen auf, während die Freisetzung von IL-10 deutlichen Schwankungen zwischen den einzelnen Spendern für die Primärzellen unterlag.

Auch in Monokulturen verschiedener Zelltypen (Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen und Endothelzellen) wurden keine strahleninduzierte Veränderungen in der Freisetzung von TNF- α , TGF- β und IL-10 beobachtet.

Die Veränderung der Zytokin-Freisetzung durch Bestrahlung wurde im Rahmen dieser Arbeit auch *in vivo* untersucht. Hierzu wurden die Konzentrationen der genannten Zytokine sowie weiterer Faktoren im Blutplasma von Radontherapie-Patienten bestimmt, die alle auch nach mehreren Anwendungen keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zu den Werten vor der Behandlung aufwiesen.

Eine strahleninduzierte Veränderung der Adhäsion von Lymphozyten an Endothelzellen aus verschiedenen Bereichen des vaskulären Systems, die mit einem entzündungsfördernden Zytokin (TNF- α) stimuliert worden waren, wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst unter statischen Bedingungen untersucht. Keine Reaktion auf Bestrahlung zeigte sich in Endothelzellen aus der pulmonalen Aorta. In Endothelzellen aus dem mikrovaskulären Gewebe der Haut wurde hingegen eine signifikante Reduktion der Adhäsion nach Bestrahlung beobachtet. Diese Reduktion trat jedoch sowohl bei niedrigen als auch bei hohen Dosen auf. Die ersten Experimente zur Veränderung der Adhäsion unter dynamischen Bedingungen bestätigten die Ergebnisse des statischen Adhäsionstests, die Inhibition war sogar deutlicher als unter statischen Bedingungen. Die Experimente haben gezeigt, dass TGF- β für diesen Zelltyp eine essentielle Rolle im Prozess der strahleninduzierten Veränderung der Adhäsion spielt. Die Ergebnisse zur Adhäsion für die Effekte von dünn- und dicht-ionisierende Bestrahlung weisen auf einen für die Mikrovaskulatur spezifischen Beitrag zur Hemmung einer bestehenden Entzündung nach Bestrahlung hin, der jedoch im verwendeten *in vitro* System nicht auf niedrige Dosen beschränkt war.

Abstract

The treatment of chronic inflammatory diseases such as ankylosing spondylitis with low doses of ionizing radiation (α -rays, photons) is used successfully for several decades. However, the molecular and cellular mechanisms that underlie this effect are not understood. The aim of this study was to investigate inflammation-related inhibitory effects of ionizing radiation on the cellular and molecular level. Since the local dose deposition of densely-ionizing radiation is not homogeneous, sparsely and densely ionizing radiation were compared especially in the low-dose range (0,1-1Gy). For this purpose X-ray or accelerated ions were used for the experiments presented in the frame of this thesis.

For the performed experiments various cell types were used, which are involved in inflammatory processes and could therefore potentially be involved in the anti-inflammatory effects. Therefore vascular endothelial cells and cells of the immune system (lymphocytes, monocytes and macrophages) were investigated regarding the following biological endpoints: induction of apoptosis, phagocytic activity of macrophages in co-culture with apoptotic lymphocytes, adhesion of lymphocytes to endothelial cells and the release of cytokines in vascular and immune cells. The induction of apoptosis was investigated in connection with a possible anti-inflammatory effect of apoptotic cells on phagocytes. Inflammatory processes are partially regulated by the adhesion of immune cells to the endothelial cell layer of blood vessels followed by the transmigration into the tissue. This process is a potential indicator of anti-inflammatory effects of low-dose irradiation. The studies presented here were mainly carried out in human primary cells. Their differentiation into functional cells *in vitro* was partially established during this thesis. In order to adapt as close as possible to the situation *in vivo*, two different co-culture systems were established and an experimental system to mimic the blood flow were developed. Preliminary experiments for the examination of effects related to the radon exposure were performed with blood samples of patients which received a radon therapy.

The results of the present work confirmed that peripheral blood lymphocytes proved to be particularly radiosensitive, both for sparsely-and densely-ionizing radiation. Therefore a clear dose dependent increase of apoptosis could be detected in lymphocytes even after low dose irradiation. Neither endothelial cells nor macrophages showed a significant induction of apoptosis after irradiation. In blood cells of patients which received a radon therapy a trend to increased levels of apoptotic lymphocytes after multiple radon treatments was observed. However, this increase was not statistical significant.

In co-culture experiments with primary cells, it could be demonstrated that the induction of apoptosis in lymphocytes by ionizing radiation affects the phagocytic activity of macrophages, in particular of the M-CSF subtype which plays a role in anti-inflammatory processes. An increase in phagocytic activity was clearly detectable after irradiation of lymphocytes with X-rays or carbon ions. Thereby

the increase was dependent on the dose and thus on the number of apoptotic cells. It could not be clarified whether the increase in phagocytic activity in the co-culture causes an altered release of inflammatory cytokines, as it is discussed regarding the regulation of inflammatory processes. The release of the cytokines TNF- α and TGF- β was only poorly affected by irradiation, whereas for the release of IL-10 in the primary cells significant variations between individual donors were observed.

In the monocultures of different cell types (lymphocytes, monocytes, macrophages and endothelial cells) no radiation-induced changes concerning the release of TNF- α , TGF- β and IL-10 were observed. Furthermore the radiation induced changes in cytokine release were investigated *in vivo*. Therefore additional factors were examined in blood plasma of radon therapy patients, but as well no significant changes were observed even after multiple radon treatments.

Radiation-induced changes in adhesion of lymphocytes to endothelial cells, which were stimulated by a pro-inflammatory cytokine (TNF- α), were investigated in this study under static conditions. No response to irradiation was seen in pulmonary endothelial cells from the aorta. However, in microvascular endothelial cells from skin, a significant reduction of adhesion was observed after irradiation. This reduction occurred, however, both at low and at high doses. The experiments to alter the adhesion under dynamic conditions confirmed the results of the static adhesion assay, the inhibition was even stronger compared to the static assay. Furthermore the performed experiments have shown that TGF- β plays an essential role in the process of radiation-induced reduction of lymphocyte adhesion to endothelial cells. Taken together the obtained results indicate a specific contribution of the microvasculature to a radiation induced inhibition of an existing inflammation, which was observed both for sparsely-and densely-ionizing radiation. However, in the *in vitro* systems this could not be proved as a specific low-dose effect.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	iii
Zusammenfassung.....	iv
Abstract	vi
1 Die Niedrig-Dosis-Strahlentherapie.....	1
2 Theoretische Grundlagen	3
2.1 <i>Physikalische Grundlagen</i>	3
2.1.1 Ionisierende Strahlung	3
2.1.2 Dosis und linearer Energietransfer	4
2.2 <i>Strahlenbiologische Untersuchungen</i>	6
2.2.1 Relative biologische Wirksamkeit.....	6
2.2.2 Radon.....	7
2.3 <i>Biologische Grundlagen</i>	8
2.3.1 Das menschliche Immunsystem	8
2.3.2 Bestandteile des Immunsystems.....	8
2.3.3 Der Entzündungsprozess	10
2.3.4 Induzierte Antworten der angeborenen Immunität	11
2.3.5 Der Prozess der Extravasation.....	13
2.3.6 Autoimmunreaktionen	15
2.3.7 Apoptose	16
2.3.8 Phagozytose.....	17
2.4 <i>Zielsetzung</i>	19
2.4.1 Arbeitshypothese	21
3 Material und Methoden	22
3.1 <i>Zellkultivierung</i>	22
3.1.1 Kultivierungsbedingungen.....	22
3.1.2 Zellzahlbestimmung	22
3.1.3 Trypanblaufärbung	22
3.1.4 Zellkultivierung Endothelzellen	23
3.1.5 Isolierung und Kultivierung peripherer Blutleukozyten	24

3.2	<i>Bestrahlung</i>	26
3.2.1	Bestrahlung mit Röntgenstrahlung	26
3.2.2	Bestrahlung mit Kohlenstoffionen	26
3.2.3	Bestrahlung mit Stickstoffionen	27
3.2.4	Bestrahlung mit UV-B Strahlung.....	28
3.3	<i>Analyse der Leukozyten Populationen</i>	28
3.3.1	Durchflusszytometrie	28
3.3.2	Reinheitsbestimmung der Leukozyten-Populationen	28
3.3.3	Überprüfung der Makrophagen-Differenzierung.....	31
3.4	<i>Untersuchung der Adhäsion von PBL an Endothelzellen</i>	32
3.4.1	Markierung der PBL.....	32
3.4.2	Statisches Testsystem.....	33
3.4.3	Dynamisches Testsystem.....	37
3.4.4	Statistische Auswertung der Daten	41
3.5	<i>Bestimmung der Zytokin-Freisetzung</i>	41
3.5.1	Enzym-linked-immunosorbent-assay (ELISA)	41
3.5.2	Versuchsprotokoll Zytokinbestimmung	42
3.6	<i>Methoden zur Messung strahleninduzierter Apoptose</i>	44
3.6.1	Annexin-V Färbung	44
3.6.2	TUNEL-Test zur Bestimmung der DNA-Fragmentierung	46
3.7	<i>Messung der phagozytotischen Aktivität von Makrophagen</i>	48
3.7.1	Phagozytose Testsystem	48
3.7.2	Statistische Auswertung.....	49
4	Ergebnisse	50
4.1	<i>Induktion von Apoptose durch ionisierende Strahlung</i>	50
4.1.1	Induktion von Apoptose in Blut-Lymphozyten.....	50
4.1.2	Einfluss von pro- und anti-inflammatorischen Stimuli auf die Apoptose von PBL.....	51
4.1.3	Induktion von Apoptose in Makrophagen.....	52
4.1.4	Induktion von Apoptose in Endothelzellen	53
4.2	<i>Adhäsion</i>	54
4.2.1	Untersuchung des Adhäsionsverhaltens unter statischen Bedingungen.....	54
4.2.2	Einfluss von TGF- β auf das Adhäsionsverhalten von PBL.....	60
4.2.3	Untersuchung des Adhäsionsverhaltens unter dynamischen Bedingungen.....	62
4.2.4	Freisetzung von Zytokinen von Endothelzellen nach Bestrahlung.....	62

4.3	<i>Phagozytose von PBL durch Makrophagen</i>	64
4.3.1	Phagozytotische Aktivität von Makrophagen nach Co-Kultivierung mit PBL.....	64
4.3.2	Zytokin-Freisetzung nach Co-Kultivierung von Makrophagen und PBL	66
4.4	<i>Untersuchung von in vivo Effekten der Radontherapie</i>	81
4.4.1	Induktion von Apoptose in PBMC durch die Radontherapie	81
4.4.2	Zytokinkonzentration im Plasma nach Radonbehandlung.....	82
5	Diskussion	86
5.1	<i>Induktion von Apoptose durch ionisierende Strahlung</i>	87
5.1.1	Apoptose in Makrophagen	88
5.1.2	Apoptose in Endothelzellen	88
5.2	<i>Adhäsion von PBL an Endothelzellen</i>	89
5.2.1	Reduktion der PBL-Adhäsion an Endothelzellen durch ionisierende Strahlung	90
5.2.2	Einfluss von TGF- β auf die Adhäsion	94
5.2.3	Zytokin-Freisetzung durch Endothelzellen	96
5.3	<i>Phagozytose von PBL durch Makrophagen</i>	97
5.3.1	Phagozytotische Aktivität von Makrophagen nach Co-Kultivierung mit PBL.....	97
5.3.2	Zytokin-Freisetzung in Monokulturen von Monozyten, Makrophagen und PBL	99
5.3.3	Zytokin-Freisetzung in Co-Kulturen von Makrophagen und apoptotischen PBL	101
5.4	<i>Untersuchung von in vivo Effekten der Radontherapie</i>	104
5.4.1	Steigerung der Apoptoserate in PBMC.....	104
5.4.2	Veränderung der Zytokinkonzentration im Blutplasma.....	105
5.5	<i>Fazit</i>	106
5.6	<i>Ausblick</i>	107
6	Anhang	109
	<i>Literaturverzeichnis</i>	109
	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	117
	<i>Wertetabellen</i>	119
	<i>Chemikalienliste</i>	127
	<i>Lebenslauf</i>	129
	<i>Ehrenwörtliche Erklärung</i>	130

1 Die Niedrig-Dosis-Strahlentherapie

Bereits seit über 100 Jahren wird die Niedrig-Dosis-Strahlentherapie zur Behandlung von chronisch entzündlichen Erkrankungen (z.B. Arthritis, Morbus Bechterew, Ekzemen und Psoriasis) angewendet. Die klinische Wirkung dieser Behandlungsform besteht in einer Hemmung der Entzündung und Linderung der Schmerzen. [1] Durch das wiedererlangte Wohlbefinden des Patienten kann dessen Mobilität gesteigert werden. In den letzten Jahrzehnten hat sich diese Methode zu einer etablierten Behandlungsform entwickelt. So werden allein in Deutschland jährlich etwa 20.000 Patienten bestrahlt, von denen etwa 12.600 unter schmerzhaft entzündlich-degenerativen Gelenkerkrankungen leiden. [2]

Es gibt im europäischen Raum zwei Arten der Niedrig-Dosis-Strahlentherapie, die sich durch die Verwendung unterschiedlicher Strahlenarten unterscheiden. Zum einen werden Photonen verwendet (in der Regel Röntgenstrahlung), zum anderen das radioaktive Edelgas Radon, bei dessen Zerfall vor allem Strahlung durch die entstehende α -Teilchen¹ abgegeben wird.

Bei der Bestrahlung mit Photonen werden nur die lokalen Entzündungsstellen direkt bestrahlt. Bei der Radon-Therapie hingegen erhalten die Patienten eine Art „Ganzkörperbestrahlung“ indem sie Radon entweder inhalieren oder in Radon-Wasser baden. Die applizierten Dosen in der Photonen-Therapie bewegen sich in einem Bereich von 2-6Gy die in 5-6 Fraktionen von 0,5-1Gy 2-3 mal wöchentlich gegeben werden [1, 3]. Für die Photonen-Therapie belegen mehrere klinische Studien die Wirksamkeit der Behandlung für mehrere Erkrankungen, wie z.B. Periarthritis humeroscapularis [4], Hidradenitis axillaris [5], Epicondylitis humeri [6], Morbus Dupytren [7], Mastitis oder einer postoperativen Parotitis [8].

Chronisch-entzündliche Erkrankungen werden in Europa seit ca. 50 Jahren durch eine Radon-Therapie behandelt. Die Hauptindikation für die Radon-Therapie ist Morbus-Bechterew [9]. Allein im österreichischen Heilstollen in Bad Gastein werden jährlich ca. 3000 Patienten mit Morbus Bechterew behandelt. Hierbei handelt es sich um eine chronisch entzündliche, rheumatische Erkrankung der Wirbelsäule. Durch die entzündlichen Vorgänge in der Wirbelsäule kommt es zu Bewegungseinschränkungen bis hin zur Versteifung sowie zu Fehlstellungen. Dies führt wiederum dazu, dass die Patienten im Wirbelsäulenbereich unter teilweise starken Schmerzen leiden [10]. Die Wirksamkeit der Behandlung von Morbus Bechterew sowie weiteren chronisch-entzündlichen Erkrankungen durch die Radon-Therapie ist ebenfalls durch mehrere klinische Studien belegt [11] (Zusammenfassung in [12]). Für die Radontherapie existieren mehrere Behandlungsformen wie Wasserbäder mit

¹ Siehe Kapitel 2.1.1

radonhaltigem Wasser, Thermalbäder, Luftbäder bei Raumtemperatur bzw. Luftbäder im Quelldunst bei 34-41°C Umgebungstemperatur. Im Kurort Bad Gastein (Österreich) erfolgt die Radon-Therapie unter anderem in einem Thermalstollen bei 37-42°C und einer nahezu gesättigten Luftfeuchte [12]. Eine durchschnittliche Stollentherapie beinhaltet 9-12 Einfahrten während eines 2-3 wöchigen Kur-aufenthaltes [9]. Neben den Radon-Behandlungen wird begleitend eine Physiotherapie durchgeführt, um den Behandlungseffekt zu verbessern. Da beide Behandlungsformen bei so vielen verschiedenen Erkrankungen eine ähnliche Wirkung zeigen, ist es wahrscheinlich, dass der Effekt der Bestrahlung systemischer Natur sein muss.

Das Verständnis der zellulären und molekularen Wirkungsmechanismen der Niedrig-Dosis-Strahlentherapie ist bis jetzt noch sehr lückenhaft. Obwohl in den letzten 10-20 Jahren einige Untersuchungen zur Wirkungsweise durchgeführt wurden, konnte bis jetzt noch kein komplettes und in sich schlüssiges Erklärungsmodell entwickelt werden [1]. Einige Studien wurden *in vivo* mit Tiermodellen für Arthritis aus der pharmakologischen Forschung durchgeführt. Es konnte in allen Experimenten eine signifikante Linderung der arthritischen Symptome im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrolltieren beobachtet werden (Zusammenfassung in [1, 3]). Auch wurden *in vitro* Experimente auf zellulärer Ebene durchgeführt. So wurden einige funktionalen Mechanismen untersucht, die im Zusammenhang mit dem Entzündungsprozess stehen, wie bspw. Zytokinausschüttung oder Apoptose. Jedoch reicht der bisherige Kenntnisstand zu den zellulären und molekularen Hintergründen der Niedrig-Dosis-Therapie bei weitem nicht aus um ein schlüssiges Modell zur Erklärung dieses Effekts aufstellen zu können.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Physikalische Grundlagen

2.1.1 Ionisierende Strahlung

Strahlung bedeutet ganz allgemein bewegte Energie. Sie ist dualer Natur und kann entweder als Welle oder als Teilchen angesehen werden. Trifft Strahlung auf Materie, wird Energie auf das bestrahlte Medium abgegeben. Kommt es nur zur Anhebung eines Elektrons auf ein höheres Energieniveau spricht man von einer Anregung. Reicht die Energie hingegen aus, um Elektronen aus der Atomhülle herauszulösen, kommt es zur Ionisation.

Ionisierende Strahlung wird in elektromagnetische Strahlung und Teilchenstrahlung unterteilt. Dabei handelt es sich bei elektromagnetischer Strahlung um masselose und ungeladene Photonen. Das Spektrum der elektromagnetischen Strahlung reicht von den kurzwelligen Röntgen- und γ -Strahlen, über das UV- und visuelle Licht bis zum langwelligen Radiosignal. Allerdings besitzt nur die Strahlung im kurzwelligen Bereich (Wellenlänge $<200\text{nm}$) die zur Ionisation notwendige Energie. [13]

Die Energie (E) der Photonen lässt sich mit folgenden Formeln aus der Wellenlänge (λ), der Frequenz (ν), der Lichtgeschwindigkeit (c) und dem Planckschen Wirkungsquantum (h) berechnen:

$$\nu = \frac{c}{\lambda}; E = h \cdot \nu$$

-Formel 1-

Die Teilchen-Strahlung umfasst Teilchen mit Masse, z.B. ungeladene Neutronen, Elektronen, Protonen, α -Teilchen und beschleunigten schweren Ionen. Ein α -Teilchen besteht wie ein Helium-Atomkern aus je zwei Protonen und Neutronen. α -Teilchen entstehen beim Zerfall von schweren radioaktiven Nukliden wie Uran oder Radium. Typischerweise weisen α -Partikel eine Energie von 2-5MeV/u auf, die im Verhältnis zu ihrer relativ großen Masse niedrig ist. Deshalb haben α -Partikel eine geringe Reichweite. In Luft beträgt sie ungefähr 10cm, in Wasser oder organischer Materie sogar nur 40 μm . [14]

Allerdings besitzen α -Partikel im Vergleich zu Photonenstrahlen eine weitaus höhere Ionisationsdichte (siehe Kapitel 2.1.2). Die Schadensdichte in einer bestrahlten Zelle oder im Gewebe ist entsprechend höher. Daraus ergibt sich eine erhöhte biologische Wirksamkeit für die Schädigung relevanter Strukturen. [14]

2.1.2 Dosis und linearer Energietransfer

Die durch elektromagnetische Strahlung übertragene Energie wird von den Ziel-Atomen und – Molekülen absorbiert. Es existieren hierbei verschiedene Mechanismen zur Energieübertragung. Im Comptonprozess wird die Energie des Photons teilweise auf ein sogenanntes „freies“ Elektron übertragen, dessen Bindungsenergie im Vergleich zur Energie des Photons vernachlässigbar klein ist. Die übertragene Energie wird in kinetische Energie umgesetzt, das Photon wird durch die Kollision abgelenkt und fliegt mit verringerter Energie weiter. In der bestrahlten Materie führt das zur Bildung von beschleunigten Elektronen, die dann wiederum mit anderen Molekülen reagieren können. Ein weiterer Prozess der Energieabgabe ist der photoelektrische Prozess. Hierbei wird ebenfalls ein Elektron aus seinem Orbital geschossen, welches eine hohe Bindungsenergie besitzt. Das Photon gibt hierbei seine gesamte Energie auf das Elektron ab. Die freie Stelle im Atomorbital wird dann durch ein Elektron aus einer höheren Orbitalhülle ersetzt. Bei diesem Prozess wird wiederum ein Photon emittiert. Dieses Photon verfügt jedoch nur über eine weitaus geringere Energie als das ursprüngliche Photon und hat daher so gut wie keinen Anteil am biologischen Strahlungseffekt. [14]

Im Gegensatz zu elektromagnetischer Strahlung, kommt es bei Teilchen-Strahlung, zu denen auch α -Teilchen gehören, zu weitaus mehr Ionisationsereignissen entlang der Flugbahn eines beschleunigten Teilchens. Aus diesem Grund bezeichnet man Teilchenstrahlung im Gegensatz zu dünn-ionisierenden Photonen (Röntgen- und γ -Strahlung) auch als dicht-ionisierende Strahlung. Die Wechselwirkung von geladenen Teilchen mit Atomen des bestrahlten Mediums beruht überwiegend auf der Coulombkraft. Durch die elektrische Anziehungskraft werden die Elektronen aus dem Atomorbital „herausgezogen“. Dies führt zu Entstehung von beschleunigten Sekundärelektronen entlang der Flugbahn des Ions. Zu Beginn des Eintritts in das bestrahlte Medium finden wegen der hohen Geschwindigkeit des Ions nur wenige Ionisationsereignisse statt. Das Ion wird aufgrund seiner großen Masse kaum von seiner Flugbahn abgelenkt, verliert jedoch kontinuierlich Energie auf der Wegstrecke. Das führt zu einer ständigen Verlangsamung bis das Ion schließlich ganz gestoppt wird. Je langsamer das Ion wird, desto häufiger werden auch die Ionisationsereignisse entlang der Wegstrecke. Die größte Energieabgabe findet in dem Moment des Abstoppens des Ions statt. Die Energieabgabe (E) entlang der Wegstrecke (s) eines bewegten Teilchens wird als linearer Energietransfer (LET) bezeichnet, dessen Höhe von der Geschwindigkeit, der Kernladungszahl und anderen Parametern abhängt (Bethe-Bloch Formel). Je höher die Kernladungszahl des geladenen Teilchens, desto höher der LET. [15]

Der LET wird nach folgender Formel berechnet:

$$LET = \frac{dE}{ds} \left[\frac{keV}{\mu m} \right]$$

-Formel 2-

Die Energieübertragung auf die Sekundärelektronen ist abhängig von der Energie des primären Ions. Je mehr Energie auf die Sekundärelektronen übertragen wird, umso größer ist der Spurdurchmesser. Die lokale Ionisationsdichte ist also von der Energie des primären Ions und dem LET abhängig. Die Energiedeposition innerhalb einer Spur nimmt radial vom Spurzentrum exponentiell ab. Aus diesem Grund sind die Schäden nicht gleichmäßig über das bestrahlte Volumen verteilt, sondern konzentrieren sich entlang der Wegstrecke. Gleichzeitig mit der Energie der primären Ionen verlängert sich auch die Strecke, die sie zurücklegen können (Eindringtiefe). Misst man die Energiedeposition entlang der Wegstrecke eines Ions, erhält man ein sogenanntes Tiefendosisprofil (Abb. 1). Diese Profile sind jeweils charakteristisch für die verschiedenen Strahlenarten. [14, 15]

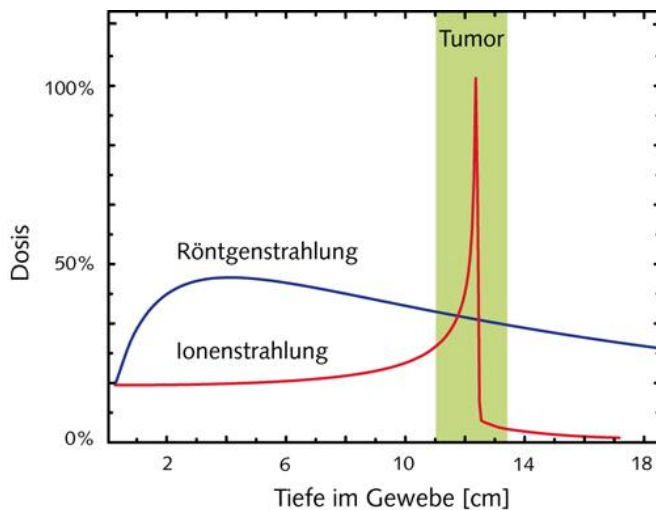


Abb. 1: Vergleich der Tiefendosisprofile von Röntgen- und Ionenstrahlung. Röntgenstrahlung zeigt die größte Energieabgabe bereits kurz nach der Eintrittsstelle. Ionenstrahlung zeigt die größte Energieabgabe erst am Ende der Wegstrecke (Bragg-Maximum). [16]

Das Tiefendosisprofil von Röntgenstrahlung zeigt die größte Energiedeposition am Anfang der Wegstrecke. Mit steigender Eindringtiefe nimmt die Energiedeposition exponentiell ab. Ionenstrahlung weist hingegen ein sogenanntes invertiertes Tiefendosisprofil auf: Die Dosis steigt mit zunehmender Eindringtiefe und abnehmender Energie des Teilchens an. Das Dosis-Maximum am Ende der Wegstrecke wird als Bragg-Maximum bezeichnet. Nach dem Bragg-Maximum fällt die Dosis stark ab und geht gegen null. Zur Definition der Energieabgabe von Strahlung wird die Energiedosis verwendet. Die Energiedosis (D) ist definiert als der Quotient der absorbierten Energie (E) innerhalb eines definierten Volumens sowie der Masse (m) des Volumens. Die Einheit der Energiedosis ist Gray (Gy). Die Berechnung erfolgt nach folgender Formel:

$$D = \frac{\Delta E}{\Delta m} \left[\frac{J}{kg} \right]$$

-Formel 3-

Zur Berechnung der Dosis für Teilchenstrahlung wird folgende Formel verwendet:

$$D = 1,6 * 10^{-9} * LET * \phi * \rho^{-1}$$

-Formel 4-

LET [keV/μm]
Teilchenfluenz ϕ [T/cm²]
Dichte ρ [g/cm³]

Formel 4 setzt sich zusammen aus dem LET [keV/μm], der Teilchenfluenz ϕ [T/cm²] und der Dichte ρ [g/cm³] des bestrahlten Mediums. Da biologische Materie zum größten Teil aus Wasser besteht, kann ρ gleich 1 gesetzt werden. Somit kann die Dosis aus dem LET und der Teilchenfluenz berechnet werden. [15]

2.2 Strahlenbiologische Untersuchungen

Um die biologische Wirkung von ionisierender Strahlung zu untersuchen, reicht der Dosisbegriff allein nicht aus. So würde die Energie einer Ganzkörperbestrahlung mit 10Gy einer Erhöhung der Körpertemperatur um ca. 0,002°C entsprechen. Während die Bestrahlung mit 10Gy eine tödliche Wirkung hat, hätte die Erwärmung keinerlei Auswirkung. Zum Verständnis der Wirkung von ionisierender Strahlung auf biologische Systeme, werden daher die Strahleneffekte experimentell (*in vitro* oder *in vivo*) sowohl auf zellulärer- als auch auf molekularer Ebene untersucht. Hierbei wird grundlegend von einer linearen Abhängigkeit zwischen Dosis und Wirkung ausgegangen. Dies gilt z.B. für DNA-Schäden, Zelltod oder chromosomale Aberrationen. Die Gültigkeit dieses Modells erstreckt sich jedoch nicht auf alle Dosisbereiche. So wurden besonders im Niedrig-Dosisbereich auch nicht lineare Dosis-Wirkungs-Abhängigkeiten beschrieben. [14].

2.2.1 Relative biologische Wirksamkeit

Die biologische Wirkung der verschiedenen Strahlenarten kann sehr stark variieren. So ist z.B. die Wirkung von dicht-ionisierender Strahlung deutlich höher als die Wirkung von dünn-ionisierender Strahlung. Aus diesem Grund verwendet man zum Vergleich der Wirkungen von verschiedenen Strahlenarten die sogenannte relative biologische Wirksamkeit (RBW). Die RBW ist definiert als der Quotient der Dosis von zwei verschiedenen Strahlenarten, bei welcher jeweils der gleiche biologische Effekt (Isoeffekt) eintritt. Üblicherweise wird Röntgenstrahlung (D_γ) als Referenz zur Teststrahlung (D_{Ion}) verwendet. [14]

$$RBW = \frac{D_\gamma}{D_{\text{Ion}}} \Big|_{\text{Isoeffekt}}$$

-Formel 6-

2.2.2 Radon

Radon (^{222}Rn) ist ein radioaktives Edelgas welches sehr erfolgreich in der Behandlung von chronisch-entzündlichen Erkrankungen eingesetzt wird. Es entsteht durch den Zerfall von Radium (^{226}Ra) und hat selbst wiederum eine Halbwertszeit von 3,8 Tagen. Beim Zerfall von Radium und Radon werden α -Partikel freigesetzt. α -Strahlung entsteht ebenfalls teilweise beim Zerfall der Folgeprodukte (siehe Abb. 2). Die α -Strahlung von Radon und seinen Zerfallsprodukten macht den größten Teil der natürlichen Hintergrundstrahlung aus. Als Produkt in der Zerfallskette von Uran entsteht Radon hauptsächlich in Gesteinsschichten und kann dann aus ihnen herausdiffundieren. Als Gas kommt es somit in allen natürlichen Lebensräumen vor. Aufgrund der sehr geringen Konzentration an der freien Luft ist die durch die emittierte Strahlung freigesetzte Energiedosis jedoch verschwindend gering. Die lokalen Konzentrationen können allerdings sehr unterschiedlich sein. So kann sich das Gas z.B. in Minen und geschlossenen Kellerräumen anreichern. Außerdem kann die Konzentration durch den Luftdruck beeinflusst werden. [17]

Die bei der klinischen Anwendung von Radon relevanten Dosen konnten bisher nur geschätzt werden (siehe Kapitel 1). Basierend auf Aktivitätsmessungen im Radonstollen und in Wannenbädern beträgt die mittlere Dosis während einer Kur mit insgesamt 10 Anwendungen für die Epidermis ca. 2mGy. Die mittlere Dosis für das gesamte Hautgewebe liegt bei 30 μ Gy und die Dosen in den übrigen Organen ebenfalls bei wenigen μ Gy. Es muss demnach davon ausgegangen werden, dass die applizierten Dosen sehr gering sind. [12]

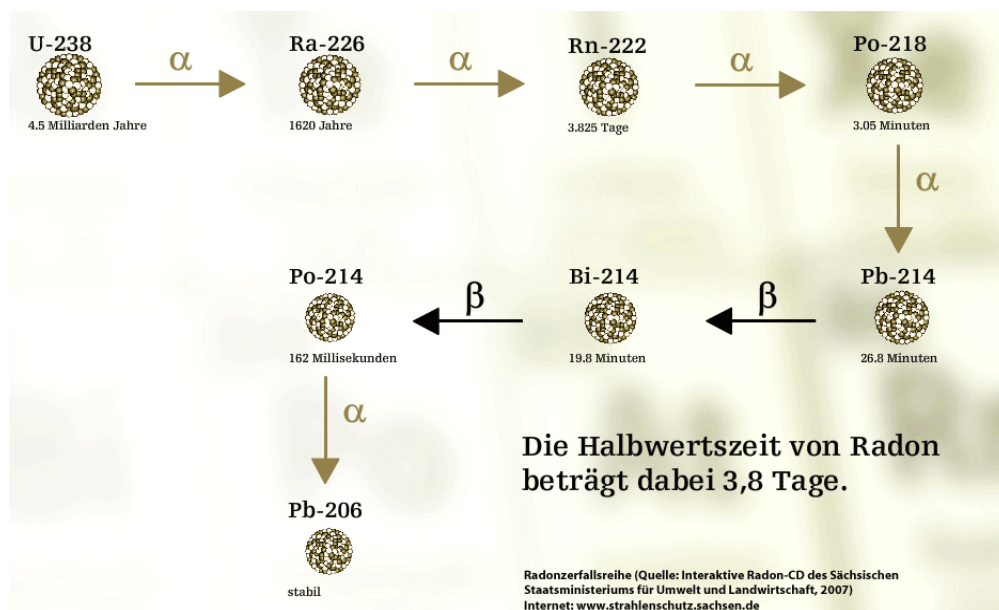


Abb. 2: Zerfallsreihe von Radon (Quelle: Sächsisches Ministerium für Umwelt und Landwirtschaft)

2.3 Biologische Grundlagen

Das Haupteinsatzgebiet der Niedrig-Dosis-Strahlentherapie liegt, sowohl für Photonen- als auch für die Radontherapie, in der Behandlung von chronisch-entzündlichen Erkrankungen. Es ist somit nahe-liegend zu vermuten, dass sich die Bestrahlung, sei es lokal oder systemisch, in irgendeiner Weise auf das Immunsystem auswirkt. Zum besseren Verständnis soll im folgenden Kapitel ein kurzer Überblick über die einzelnen Bestandteile des Immunsystems sowie über relevante Mechanismen gegeben werden.

2.3.1 Das menschliche Immunsystem

Das Immunsystem besteht aus einer Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen, Proteinen und verschiedenen Gewebetypen, deren Hauptaufgabe darin besteht, das Eindringen infektiöser Keime zu verhindern. Neben dieser Hauptfunktion hat das Immunsystem aber auch noch weitere wichtige Aufgaben, wie z.B. die Wundheilung oder die Beseitigung abgestorbener Zellen. Ein intaktes Immunsystem ist somit essentiell notwendig für die Funktionsfähigkeit des Gesamtorganismus. Die Zellen des Immunsystems werden mit dem Blutstrom ständig durch den Körper bewegt und kommen somit auch in allen Organen und Geweben vor. Die Haut sowie alle weiteren epithelialen Gewebsschichten bilden die erste physikalische und auch chemische Barriere gegen körperfremde Eindringlinge. Dieser nicht adaptive Teil des Immunsystems wird auch als angeborene Immunität bezeichnet. Im Laufe der Evolution ist es einigen Krankheitserregern gelungen diese Barrieren zu umgehen. Als Gegenreaktion entwickelte sich die sogenannte adaptive Immunität. Dieser Teil des Immunsystems ist in der Lage, sehr spezifisch Krankheitserreger zu erkennen und dann zu beseitigen. Während dieses Prozesses entwickelt sich das Immunsystem weiter und ist bei einer erneuten Infektion mit dem gleichen Krankheitserreger deutlich effektiver in der Abwehrreaktion. Da die Immunantwort die Bildung von vielen aggressiven und gewebschädigenden Molekülen beinhaltet, ist es für den Organismus zwingend erforderlich, dass diese Reaktionen sehr gut kontrolliert werden. Gerät das Immunsystem außer Kontrolle, kann dies schwere inflammatorische Erkrankungen nach sich ziehen. [18]

2.3.2 Bestandteile des Immunsystems

Alle Zellen des Immunsystems entstehen zunächst im Knochenmark. Von hier wandern sie über den Blutkreislauf in die verschiedenen Gewebe und Organe. Alle zellulären Bestandteile des Blutes gehen aus denselben pluripotenten Vorläuferzellen im Knochenmark hervor. Diese werden als hämatopoetische Stammzellen bezeichnet. Der Entwicklungsprozess von der Stammzelle zur ausdifferenzierten Zelle ist in Abb. 3 dargestellt. Die „Nische“ der pluripotenten Stammzellen liegt im Knochenmark, wo sie sich im Ruhezustand befinden und nur ihren Bestand erhalten. Zur Erhaltung des Zellbestandes im Blutkreislauf treten immer wieder Stammzellen aus diesen Nischen heraus und differenzieren dabei weiter. Die erste Aufteilung findet hierbei in die lymphoiden- und myeloiden-Vorläuferzellen statt.

Aus der myeloiden Zelllinie gehen Monozyten, Makrophagen, Granulozyten und dendritische Zellen sowie Erythrozyten und Thrombozyten hervor. Letztere sind allerdings kein Bestandteil des Immunsystems sind. [19]

Monozyten sind die Vorstufe der Makrophagen, die vor allem im Blutkreislauf zirkulieren, von dort in die verschiedenen Gewebe migrieren und zu Makrophagen differenzieren. Diese Zellen können Phagozytose betreiben, d.h. sie sind in der Lage Fremdkörper sowie abgestorbene Zellen aufzunehmen. Die Hauptaufgabe der dendritischen Zellen besteht in der Präsentation von Antigenen. Diese Zellen befinden sich im Gewebe und können ebenfalls Phagozytose betreiben. Granulozyten werden in drei Gruppen unterteilt: neutrophile, basophile und eosinophile. Die Bezeichnung beruht auf den jeweiligen histologischen Färbemethoden. Granulozyten sind nur sehr kurzlebig, werden hauptsächlich im Verlauf der Immunantwort gebildet und wandern dann zum Infektionsherd. Die genauen Funktionen der Granulozyten sind noch nicht vollständig bekannt. Jedoch sind alle Granulozyten zur Phagozytose befähigt. Man nimmt an, dass basophile und eosinophile Granulozyten vor allem an der Abwehr von parasitären Infektionen beteiligt sind. Alle Zellen der myeloiden Zelllinie sind Bestandteil der angeborenen Immunität. [19]

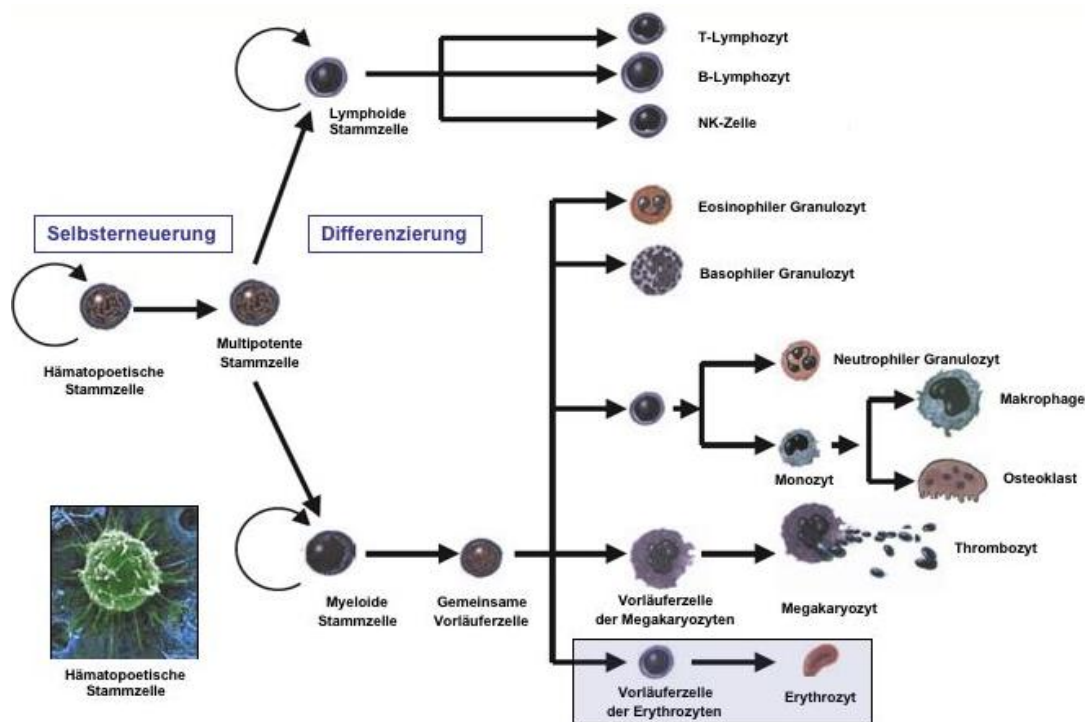


Abb. 3: Prozess der Hämatopoese. Entwicklungsprozess beginnend von der hämatopoetischen Stammzelle, über die lymphoide- oder myeloide-Vorläuferzelle zu den verschiedenen Zellen des Blutes (Quelle:[20]).

Aus den lymphoiden Vorläuferzellen gehen B- und T-Lymphozyten sowie natürliche Killerzellen (NK) hervor. B- und T-Lymphozyten haben Funktionen in der adaptiven Immunität. B-Lymphozyten sind für die Produktion von Antikörpern verantwortlich. Hierbei trägt jeder B-Lymphozyt einen Rezeptor

Seite | 9

(BCR) für ein spezifisches Antigen. Wenn es zu einem Kontakt mit dem entsprechenden Antigen kommt, wird die B-Zelle aktiviert und differenziert zur Plasmazelle, die dann mit der Ausschüttung des korrespondierenden Antikörpers beginnt. T-Lymphozyten tragen einen ähnlichen Rezeptor (TCR) wie B-Lymphozyten, der sich jedoch in einigen Punkten vom BCR unterscheidet, wie in der Fähigkeit Antigene zu erkennen, die bereits in Wirtszellen eingedrungen sind. Es gibt zwei Klassen von T-Lymphozyten: Zum einen gibt es zytotoxische Zellen, die nach ihrer Aktivierung für das Abtöten von virusinfizierten Zellen verantwortlich sind und zum anderen sogenannte T-Helfer (T_H) Zellen, die sowohl B-Zellen als auch Makrophagen aktivieren können. Während B-Lymphozyten bereits im Knochenmark ausdifferenzieren, geschieht dies bei T-Lymphozyten erst wenn sie das Knochenmark verlassen haben und sich im Thymus befinden, der ein Teil des lymphatischen Gewebes ist. Die Antigene von eingedrungen Fremdkörpern werden von Makrophagen oder dendritischen Zellen in die lymphatischen Gewebe transportiert. Dort werden sie dann den Lymphozyten präsentiert. Werden Lymphozyten in den Lymphgefäßen durch ein Antigen aktiviert, werden sie dort festgehalten und differenzieren in Effektorzellen, die für die Auslösung der spezifischen Immunantwort verantwortlich sind. Nicht aktivierte Lymphozyten (sogenannte naive Lymphozyten) zirkulieren fortwährend zwischen Blutkreislauf und den lymphatischen Geweben. NK-Zellen bilden die dritte Zelllinie der lymphatischen Zellen. Sie sind nicht ein Teil der adaptiven, sondern der angeborenen Immunität. Ihre Funktion besteht in der Erkennung von anomalen Zellen wie z.B. bestimmte Tumor- oder virusinfizierte Zellen. [19]

2.3.3 Der Entzündungsprozess

Die Hauptfunktionen der Entzündungsreaktion sind die Rekrutierung von Effektormolekülen (z.B. Chemokine oder Zytokine) an den Infektionsherd, um die Vernichtung eingedrungenen Keime zu verstärken. Des Weiteren wird eine physikalische Barriere gebildet, die ein weiteres Ausbreiten einer Infektion verhindert. Zudem wird der Wundheilungsprozess eingeleitet, um das geschädigte Gewebe wieder zu reparieren. Das Erscheinungsbild einer Entzündung zeichnet sich durch Schmerz, Rötung, Hitze und Schwellung in der Entzündungsstelle aus, welches auf folgende Veränderungen im betroffenen Gewebe zurückzuführen ist: Erstens kommt es durch Schwellung der Gefäßwand zu einer Vergrößerung des Gefäßdurchmessers der lokalen Blutgefäße. Dadurch kommt es zu einer Verringerung der Fließgeschwindigkeit, was zu Hitzeentwicklung und Rötung führt. Zweitens beginnen Endothelzellen, welche die innere Gefäßwand auskleiden, verstärkt Adhäsionsmoleküle auf ihrer Oberfläche zu exprimieren, um somit die Einwanderung von Leukozyten ins Gewebe zu steigern. Dieser Prozess wird als Extravasation bezeichnet. Drittens wird die Durchlässigkeit der Gefäßwand erhöht, indem die Endothelzellen ihren geschlossenen Verbund auflösen und somit größere Spalten zwischen den Zellen entstehen. Dies führt dazu, dass verstärkt Plasmaproteine und Flüssigkeit aus dem Blut als sogenanntes Exsudat ins Gewebe eindringen können, was wiederum zu einer Schwellung und zu Schmerzen führt. All diese Prozesse werden von Zytokinen und anderen Entzündungsmediatoren ausgelöst,

die von aktivierten Makrophagen gebildet werden. Auf die genaue Funktion der einzelnen Zytokine wird in weiteren Kapiteln genauer eingegangen. [19]

2.3.4 Induzierte Antworten der angeborenen Immunität

Die gesamten Immunantworten der angeborenen Immunität beruhen überwiegend auf Zytokinen und Chemokinen, die für die Stimulierung der entsprechenden Effektorzellen verantwortlich sind. Zytokine sind kleine Proteine (~25kDa), die von verschiedenen Zellen als Reaktion auf eine Aktivierung freigesetzt werden. Sie können auf verschiedene Weise auf andere Zellen einwirken und deren Verhalten verändern. Sie können autokrin wirken, indem sie auf die Zelle einwirken die sie freigesetzt hat. Sie können parakrin wirken, indem sie Zellen im lokalen Gewebe beeinflussen oder sie können endokrin wirken, wenn sie auf entfernt liegende Zellen einwirken. Chemokine sind eine Unterklasse von Zytokinen, die chemotaktisch auf Zellen des Immunsystems wirken können. [19]

2.3.4.1 Chemokine

Chemokine werden bereits sehr früh nach Entstehung einer Entzündung von den Zellen des betroffenen Gewebes gebildet. Diese Proteine können eine gerichtete Chemotaxis induzieren. Alle Chemokine weisen ähnliche Aminosäuresequenzen auf und ihre Rezeptoren sind ausschließlich integrale Membranproteine, die sieben membranumspannende Helices besitzen. Die Signalweiterleitung erfolgt bei allen Chemokinrezeptoren über GTP-bindende Proteine. Die Hauptfunktion der Chemokine liegt in der Mobilisierung von Leukozyten (v.a. Monozyten und neutrophile Zellen). Besonders wichtige Chemokine sind IL-8 und das Makrophagen-Chemoattraktorprotein-1 (MCP-1). Beide Moleküle erfüllen zwei Funktionen: Zum einen wirken sie auf Leukozyten ein, die im Bereich der Infektion an Endothelzellen entlang „rollen“, indem sie eine Konformationsänderung der Adhäsionsmoleküle auf den Leukozyten - den Integrinen - bewirken. Sie bewirken somit eine stabile Bindung zwischen Leukozyt und Endothelzellen, was wiederum dazu führt, dass der Leukozyt die Gefäßwand durchdringt (mehr dazu in Kapitel 2.3.5). Zum anderen wird durch den Aufbau eines Gradienten die Wanderung der Leukozyten gesteuert. Dies wird erreicht, indem die Chemokine an Proteinen der extrazellulären Matrix und an Proteoglykanmoleküle auf Endothelzellen gebunden werden. Hierdurch werden die Chemokine auf einem stabilen Substrat befestigt, auf dem sich dann die Leukozyten bewegen können. [19]

2.3.4.2 Zytokine

Zytokine fungieren im Organismus als Mediatoren von Entzündung, wobei es sowohl entzündungsfördernde als auch hemmende Zytokine gibt. Bezüglich ihrer strukturellen Eigenschaften können Zytokine und ihre Rezeptoren in drei Hauptfamilien zusammengefasst werden: die Hämatopoetin-Familie, zu denen Wachstumshormone und viele Interleukine (IL) zählen, die TNF-Familie, deren Ver-

treter sowohl in der angeborenen als auch in der adaptiven Immunantwort von Bedeutung sind und auch einige Membranproteine umfasst, sowie die Chemokin-Familie die alle Chemokine umfasst. [19]

Hier soll ein Überblick über einige Zytokine gegeben werden, denen eine Rolle im Zusammenhang mit der Niedrig-Dosis-Strahlentherapie zugeschrieben wird:

TGF- β

Das Zytokin *Transforming-Growth-Factor- β* (TGF- β) wird als pleiotrop bezeichnet, da es verschiedene Prozesse beeinflussen kann, z.B. der Apoptose, der Angiogenese, der Wundheilung, der Immunregulation und der Tumorentwicklung. Nahezu alle Zellen besitzen Rezeptoren für TGF- β . Mindestens eine von den drei bekannten Isoformen wird in jedem Gewebe oder Organ gebildet. TGF- β ist ebenfalls in größeren Mengen im Plasma enthalten. Außerdem findet man es in gebundener Form an verschiedenen Matrixproteinen im ganzen Körper. [21]

TGF- β wird jedoch nicht wie andere Zytokine in einer biologisch aktiven Form freigesetzt, sondern liegt zunächst in einer inaktiven Form vor. Die inaktive Form setzt sich als Dimer aus TGF- β und dem sogenannten *latency associated protein* (LAP) zusammen. Das LAP ist kovalent an den N-Terminus von TGF- β gebunden und muss zur Aktivierung abgespalten werden. Die Aktivierung *in vitro* kann leicht durch eine Azidifikation erreicht werden. Zur Aktivierung *in vivo* werden mehrere mögliche Mechanismen diskutiert. Zum einen kann die Spaltung durch ROS induziert werden. Außerdem sind Proteasen des fibrinolytischen Systems (z.B. Plasmin) in der Lage TGF- β zu aktivieren [22]

Alle Zellen des Immunsystems werden durch TGF- β beeinflusst, welches sowohl anti-inflammatorische als auch immunsuppressive Funktionen hat. TGF- β weist besonders im Bezug auf T-Zellen inhibierende Funktionen auf. So wirkt TGF- β inhibierend auf das T-Zell Wachstum als auch auf die Differenzierung in T_H -1-, T_H -2- und zytotoxische Zellen. Allerdings können durch TGF- β auch pro-inflammatorische Effekte induziert werden. So führt z.B. eine Stimulierung von naiven T-Lymphozyten mit TGF- β und IL-6 zu einer Differenzierung in T_H -17 Zellen, die pro-inflammatorisch wirken. Welche Reaktionen durch TGF- β jeweils induziert werden, ist sehr stark vom entsprechenden Umfeld sowie von weiteren vorhandenen Stimulierungsfaktoren abhängig. [22]

TNF- α

Der Tumor-Nekrose-Faktor- α ist ein wichtiges pro-inflammatorisches Zytokin der TNF/TNFR² Protein-Superfamilie, deren Proteine hauptsächlich von Immunzellen gebildet werden und Einfluss auf Proliferation, Überleben, Differenzierung sowie Apoptose haben [21]. TNF- α liegt als Trimer vor und wird

² Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor

vor allem von aktivierten Monozyten, Makrophagen, NK-Zellen, einigen T-Lymphozyten, Mastzellen sowie Fibroblasten gebildet. Die Bildung von $\text{TNF-}\alpha$ kann über bakterielle Produkte wie LPS sowie durch $\text{IL1-}\beta$ induziert werden. Die Induktion kann hierbei über die TLR stattfinden als auch über den MAP-Kinase-Weg und $\text{NF-}\kappa\text{B}$. $\text{TNF-}\alpha$ stimuliert die Freisetzung von IL-1 und IL-6, die beide eine pro-inflammatorische Wirkung haben. [23]

Des Weiteren erhöht $\text{TNF-}\alpha$ die Produktion von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen und steigert somit die Extravasation. Außerdem wirkt es stimulierend auf die phagozytische Aktivität von Makrophagen. $\text{TNF-}\alpha$ steht auch in Verbindung mit der Entstehung von chronisch-entzündlichen Erkrankungen wie Arthritis. [24]

IL-10

Interleukin-10 ist neben $\text{TGF-}\beta$ eines der wichtigsten anti-inflammatorischen Zytokine und spielt eine große Rolle in der Aufrechterhaltung der Immuntoleranz und wird von einer Vielzahl unterschiedlicher Zellen gebildet, wie Monozyten und $\text{T}_{\text{H}2}$ -Lymphozyten, oder von B-Lymphozyten [21]. Neben vielen anderen Prozessen fördert IL-10 die Phagozytose und hemmt die Antigenpräsentation von Monozyten und beeinflusst die Differenzierung der Monozyten dahingehend, dass sie sich eher in Makrophagen als in dendritische Zellen entwickeln. [25]

GM-CSF und M-CSF

Der *Granulocyte/Macrophage-Colony-stimulating-Factor* (GM-CSF) wurde ursprünglich als *in vitro* Differenzierungsfaktor für Makrophagen und Granulozyten entdeckt. *In vivo* hat GM-CSF jedoch keine wichtige Auswirkung auf die Proliferation und Neubildung von myeloiden Zellen. GM-CSF kann durch Monozyten, T-Lymphozyten, Fibroblasten und Endothelzellen gebildet werden, wenn diese durch Zytokine wie IL-1 und $\text{TNF-}\alpha$ stimuliert werden. [26]

Der *Macrophage-Colony-stimulating-Factor* (M-CSF) eignet sich ebenfalls zur *in vitro* Differenzierung von Makrophagen aus Blut-Monozyten, die eher ein entzündungshemmendes Verhalten entwickeln [27]. M-CSF kommt in biologisch aktiven Konzentrationen im Blutplasma vor. Eine Steigerung der Konzentration führt zu einer Erhöhung der zirkulierenden Monozyten um den Faktor 10 sowie zu einer Steigerung der Makrophagen in vielen Geweben des Organismus. Es konnte gezeigt werden, dass M-CSF *in vivo* von essentieller Bedeutung für die Reifung von Makrophagen ist [28]. Die Hauptfunktion von M-CSF liegt dabei in der Steuerung der Entwicklung von Gewebsmakrophagen, die für die Aufrechterhaltung der Funktionen der einzelnen Gewebe mit verantwortlich sind. [29]

2.3.5 Der Prozess der Extravasation

Der Prozess der Auswanderung von Leukozyten, insbesondere von Monozyten, aus den Blutgefäßen findet kontinuierlich im Körper statt. Erst wenn es zu einer Entzündung kommt, wird eine größere

Anzahl an Leukozyten dazu stimuliert, die Gefäßwand zu durchdringen. Die Mobilisierung von Leukozyten an den Entzündungsherd wird durch Adhäsionsmoleküle vermittelt, die von Endothelzellen an der Oberfläche der inneren Gefäßwand gebildet werden. Die verstärkte Expressierung der Adhäsionsmoleküle wird durch diverse Chemokine und Zytokine (z.B. TNF- α) induziert. Für die Adhäsion von Leukozyten sind drei Gruppen von Adhäsionsmolekülen von Bedeutung. [30]

- Die 1. Gruppe wird als Selektine bezeichnet. Hierbei handelt es sich um membranständige Glykoproteine, die eine distale, lektinähnliche Domäne besitzen, mit der sie Kohlenhydratgruppen binden können. Sie werden hauptsächlich auf Endothelzellen gebildet.
- Die 2. Gruppe der Adhäsionsmoleküle, die sogenannten intrazellulären Adhäsionsmoleküle (ICAM), werden ebenfalls von Endothelzellen gebildet.
- Die 3. Gruppe, die sogenannten Integrine, bilden für den Prozess der festen Adhäsion das Gegenstück zu den ICAM's auf den Leukozyten.

Man kann den Prozess der Extravasation in 4 Schritte unterteilen, die in Abb. 4 schematisch dargestellt sind. Der erste Schritt dieses Prozesses wird durch Selektine vermittelt. Die Steigerung der E-Selektin Bildung wird sowohl durch TNF- α als auch durch LPS induziert. Diese Wechselwirkung führt zu einer reversiblen Adhäsion der Leukozyten an der Gefäßwand, die es ihnen ermöglicht an dieser entlangzurollen sowie in die nächste Phase der Extravasation einzutreten. [30]

Die zweite Phase dieses Prozesses ist abhängig von der Wechselwirkung der Leukozytenintegrine LFA-1 und Mac-1 mit dem Adhäsionsmolekül ICAM-1 auf den Endothelzellen. LFA-1 und Mac-1 zeigen normalerweise nur eine geringe Adhäsion an ICAM-1. Allerdings wird durch IL-8 sowie andere Chemokine auf der Oberfläche von Endothelzellen eine Konformationsänderung dieser beiden Moleküle verursacht, wodurch die Adhäsionskapazität stark erhöht wird. Durch diese Wechselwirkung entsteht eine feste Bindung der Leukozyten an die Endotheloberfläche, wodurch das Rollen beendet wird. [30]

In der dritten Phase durchdringen die Leukozyten das Endothel und verlassen den Blutstrom. An diesem Prozess sind wiederum LFA-1 und Mac-1 sowie das Adhäsionsmolekül PECAM beteiligt, dass sich sowohl auf den Leukozyten als auch an den Verbindungsstellen der Endothelzellen befindet [31]. Die Phase des Durchtritts durch die Gefäßwand wird als Diapedese bezeichnet. Haben die Leukozyten die Endothelzellschicht durchquert, durchstoßen sie die Basalmembran, indem sie die Matrixproteine mit Hilfe von Proteasen zerstören. In der letzten Phase der Extravasation wandern die Leukozyten durch das Gewebe, entlang des Chemokingradienten (z.B. IL-8) zum Entzündungsherd. [19]

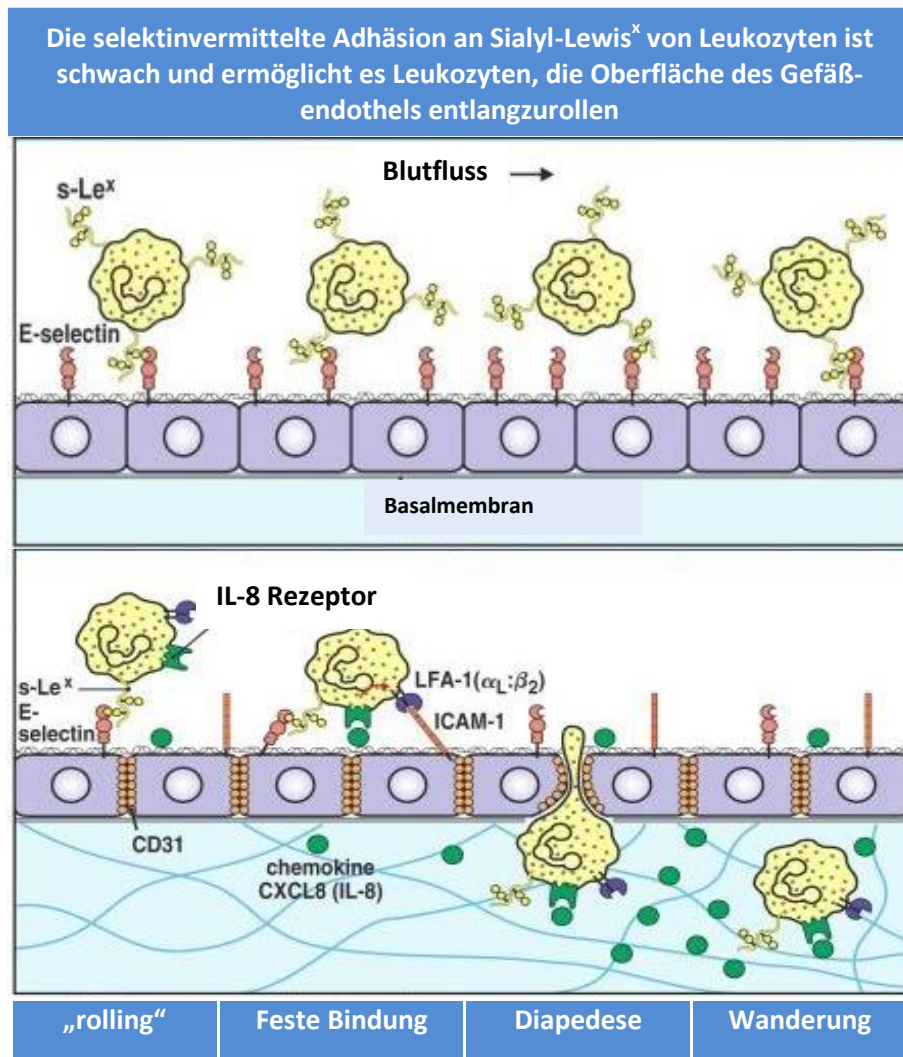


Abb. 4: Prozess der Extravasation von Leukozyten durch die Blutgefäßwand (Quelle: [19])

2.3.6 Autoimmunreaktionen

Normalerweise richten sich Immunreaktionen gegen in den Organismus eingedrungene Fremdkörper. Es kann jedoch passieren, dass sich im Körper eine spezifische Immunreaktion gegen körpereigene Moleküle (Autoantigene) entwickelt. Diese Vorgänge werden als Autoimmunreaktionen bezeichnet. Durch diese Prozesse wird das körpereigene Gewebe permanent geschädigt, da das Immunsystem nicht in der Lage ist die Autoantigene komplett zu beseitigen und deswegen dauerhaft aktiviert bleibt. Autoimmunerkrankungen können in zwei Gruppen unterteilt werden: Zum einen organspezifische Erkrankungen, die sich nur lokal auf bestimmte Organe auswirken, zum anderen systemische Erkrankungen, bei denen viele verschiedene Gewebe geschädigt werden. [19]

2.3.7 Apoptose

Der Begriff Apoptose bezeichnet den Prozess des kontrollierten Zelltods. Er steht im Gegensatz zur Nekrose, die den spontanen, unkontrollierten Zelltod beschreibt. Der Mechanismus der Apoptose fungiert als essentieller Mechanismus zur Aufrechterhaltung der Homöostase im gesamten Organismus. So findet man apoptotische Zellen in allen Organen und Geweben. Wird eine Zelle durch chemische und physikalische Einwirkung so stark geschädigt, dass sie ihre Membranintegrität verliert, führt dies zur Nekrose. Die Folge dieses Prozesses ist die unkontrollierte Ausschüttung von intrazellulären Proteinen, die aggressive Bestandteile wie Proteasen und ROS enthalten, die dann wiederum schädigend auf andere Zellen wirken können. Aus diesem Grund wirkt die Nekrose entzündungsfördernd im betroffenen Gewebe. Durch Strahlung induzierte Nekrose entsteht jedoch erst nach massiver Schädigung durch Bestrahlung mit höheren Dosen. Ob eine Zelle, die durch Bestrahlung geschädigt wird, aber nicht ihre Membranintegrität verliert, überlebt und den entstandenen Schaden reparieren kann, wird durch das Ausmaß der Schäden bestimmt. Sind die Schäden bei gegebener Reparaturkapazität der Zellen nicht reparierbar, wird in einigen Zelltypen Apoptose eingeleitet, um ein mögliches Entarten der Zelle zu verhindern. [32]

Es wurden bis jetzt drei Hauptwege zur Induktion der Apoptose beschrieben: 1. der extrinsische Signalweg, 2. der intrinsische Signalweg und 3. der Granzym B Signalweg. Bei allen Mechanismen spielen die Proteine aus der Gruppe der Caspasen eine zentrale Rolle. Ein Großteil der Aktivierungsmechanismen ist Caspase abhängig. Die meisten Caspase-Moleküle werden hierbei durch eine proteolytische Spaltung aktiviert und führen dann wiederum selbst proteolytische Spaltungen ihrer jeweiligen Substrate durch. Dadurch entsteht eine Signalkaskade, die letztendlich die apoptotischen Prozesse innerhalb der Zelle in Gang setzt. [32]

Beim extrinsischen Signalweg wird die Apoptose durch eine externe Stimulation eingeleitet. Hierbei kommt es durch eine Bindung von sogenannten „Todessignalmolekülen“ wie beispielsweise TNF- α oder FasL an die „Todesrezeptoren“ (z.B. Fas) zu einer Akkumulation und Aktivierung von Caspase 8 am Rezeptor. Durch aktive Caspase 8 werden dann die Caspasen 3 und 7 durch proteolytische Spaltung aktiviert. Durch diese werden wiederum weitere Caspasen aktiviert, was dann zur Einleitung der verschiedenen apoptotischen Prozesse führt. [32]

Beim intrinsischen Signalweg kommt es zu einer intrazellulären Aktivierung der Apoptose. Den Ausgangspunkt bildet hierbei die Gruppe der *BH3-only-proteins* (z.B. PUMA). Die Proteine dieser Gruppe werden durch diverse Stressfaktoren, wie bspw. DNA- oder oxidative-Schäden aktiviert. Dies hat die Ausbildung von BAX-BAK Oligomeren zur Folge, die sich innerhalb der äußeren Membran der Mitochondrien bilden. Durch diese Oligomere wird ein Austreten von Proteinen wie Cytochrom C aus der Intermembranschicht der Mitochondrien ins Zytosol bewirkt. Durch das austretende Cytochrom C wird in Zusammenarbeit mit Caspase 9 die Ausbildung des Apoptosom-Komplexes ermöglicht, der

dann zur Aktivierung von Caspase 9 führt. Durch aktive Caspase 9 wird dann analog zum extrinsischen Weg eine Kaskade von proteolytischen Spaltungen weiterer Caspasemoleküle eingeleitet, die dann zum Zelltod führen. [32]

Weitere wichtige Schritte im apoptotischen Prozess sind die Kondensation der DNA sowie die Fragmentierung des Zellkerns. Außerdem werden aktiv Chemokine freigesetzt, um Phagozyten zur apoptotischen Zelle zu locken die sie dann beseitigen können. [32]

2.3.8 Phagozytose

Der Prozess der Aufnahme von extrazellulären Fremdkörpern oder Zelltrümmern durch eine Zelle wird als Phagozytose bezeichnet, die unter anderem der Beseitigung von körpereigenen, sterbenden Zellen dient. Zelltrümmer von toten Zellen werden über Rezeptoren an die Oberfläche des Phagozyten gebunden und anschließend von der Zellmembran umschlossen, hierdurch wird ein sogenanntes Phagosom ausgebildet. Anschließend fusioniert das Phagosom innerhalb der Zelle mit Lysosomen, die diverse zytotoxische Substanzen wie z.B. ROS oder Proteasen enthalten. Durch diese aggressiven Moleküle erfolgt dann der Abbau der Zelltrümmer, die anschließend wieder freigesetzt werden. [18]

Das Beseitigen von abgestorbenen Zellen ist ein essentieller Prozess, um die Homöostase in den Geweben und Organen aufrecht zu erhalten. Diese Aufgabe wird hauptsächlich von sogenannten professionellen Phagozyten (gewebeständigen Makrophagen) ausgeführt. Grundsätzlich sind jedoch fast alle Zellen zur Phagozytose befähigt, z.B. Epithel- und Endothelzellen, Fibroblasten. [33]

Man kann den Prozess grundsätzlich in zwei Phasen unterteilen: Zum einen die Erkennung und zum anderen die Aufnahme/Beseitigung einer apoptotischen Zelle. Um die Erkennung durch einen Phagozyten zu ermöglichen, bildet die apoptotische Zelle auf ihrer Oberfläche spezifische Signale, die von Rezeptoren der Phagozyten erkannt werden können. Da die Beseitigung von toten Zellen extrem wichtig für den Organismus ist, haben sich im Laufe der Evolution viele verschiedene, oft auch redundante Signalmoleküle etabliert, so dass es bis heute noch nicht gelungen ist, diesen Prozess vollständig aufzuklären. [34]

In Abb. 5 ist ein Überblick über die verschiedenen Signalmoleküle von apoptotischen Zellen sowie den zugehörigen Rezeptoren auf Phagozyten und den zugehörigen Verbindungsmolekülen dargestellt. Die Veränderung der Membranstruktur spielt eine zentrale Rolle für die Markierung von apoptotischen Zellen. Hierbei kommt es zur verstärkten Umgruppierung von Phosphatidylserinen (PS) von der Innen- zur Außenseite der Membran. Dieser Vorgang läuft bereits sehr früh im apoptotischen Prozess ab. Er wird gesteuert durch die Inhibierung von zwei Enzymen (Aminophospholipid-Translocase, Phospholipid-Scramblase), die dafür verantwortlich sind, dass sich die PS auf der Innenseite der Membran befinden. [34]

Die Erkennung von PS durch Makrophagen läuft jedoch nicht nur über einen Rezeptor ab. Wie in Abb. 5 dargestellt existieren mehrere Rezeptoren auf Phagozyten, die in der Lage sind PS zu erkennen. Hinzu kommt, dass PS gar nicht selbst an die meisten Rezeptoren bindet, sondern noch ein Brückenmolekül für die Bindung benötigt. Folgende Rezeptoren sind in diesen Prozess eingebunden: PS-Rezeptor (PS-R), Vitronectin-Rezeptor($\alpha_v\beta_3$ -Integrin), die Rezeptor-Tyrosin-Kinase Mer und der β_2 -Glycoprotein-I-Rezeptor. Die zugehörigen Brückenmoleküle sind: Annexin-I, MFG-E8³, Gas 6⁴ und β_2 -Glycoprotein-I. Neben der Externalisierung von PS existieren noch weitere Signalmoleküle, die bis jetzt jedoch noch nicht vollständig untersucht wurden. [34]

In vielen Untersuchungen konnte beobachtet werden, dass ein Signalmolekül allein nicht in der Lage war, den kompletten Prozess der Phagozytose zu induzieren. Oft kam es nur zur Bindung an den Phagozyt, nicht jedoch zur Internalisierung. Von Somersan und Bhardwaj wurde ein Modell entwickelt, um das Zusammenwirken dieser Vielzahl von verschiedenen Molekülen zu erklären. Hierbei kommt es durch die vielen unterschiedlichen Signalmoleküle und Rezeptoren zur ersten Bindung der apoptotischen Zelle an den Phagozyt. Jedoch erst das „kitzeln“ durch die stereospezifische Wechselwirkung von PS mit dem PS-R löst die Internalisierung der Zelle aus. [35]

Da sich die Phagozyten normalerweise nicht in der direkten Nachbarschaft der apoptotischen Zellen befinden, müssen diese Zellen in der Lage sein chemotaktische Moleküle auszuschütten, um somit Phagozyten anzulocken. Das Phospholipid Lysophosphatidylcholin (LPC) wurde als ein solches Molekül identifiziert. LPC wird Caspase-3 abhängig während des Apoptoseprozesses ausgeschüttet und ist in der Lage Monozyten anzulocken. [34]

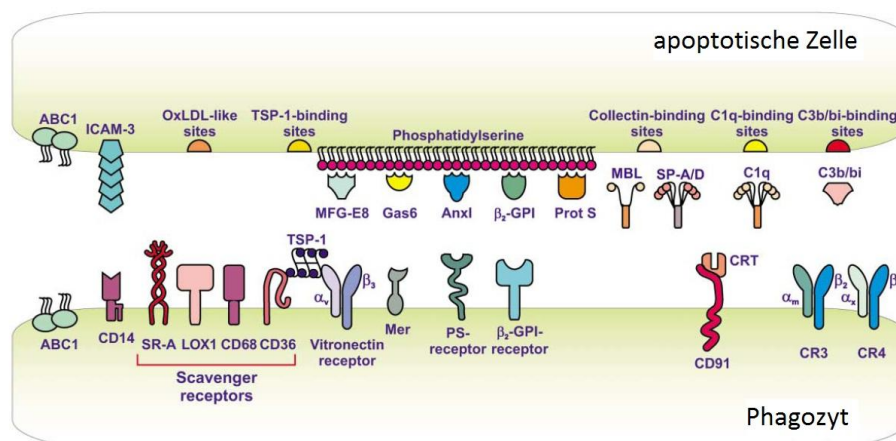


Abb. 5: Signale auf apoptotischen Zellen zur Erkennung durch Phagozyten sowie deren Rezeptoren und Verbindungsmolekülen zwischen Erkennungssignal und entsprechendem Rezeptor. (Quelle: [34])

³ Milk-fat-globule-EGF-8

⁴ Growth-arrest-specific 6

Nach der Bindung und Erkennung der apoptotischen Zelle durch den Phagozyt, folgt die Internalisierung. Hierzu wird das Zytoskelett um die Bindungsstelle herum umorganisiert. So kommt es zur Ausbildung von charakteristischen F-Aktin-reichen Einstülpungen an der Bindungsstelle. Der Signalweg in der phagozytierenden Zelle, der diesen Prozess auslöst, ist bis jetzt nicht vollständig erforscht [33]. Nachdem die apoptotische Zelle inkorporiert wurde, beginnt im Phagosom zunächst der Abbau der zellulären Bestandteile. Dieser Prozess kann entweder zur vollständigen Auflösung der Zelle führen oder es kommt nur zum teilweisen Abbau der Zelle und einer anschließenden Präsentation von Zellfragmenten auf der Oberfläche des Phagozyten. [34]

2.4 Zielsetzung

Die Niedrig-Dosis-Strahlentherapie bietet eine wirksame und kostengünstige Alternative zur Behandlung von chronisch-entzündlichen Erkrankungen. Die Bestrahlung mit Röntgenstrahlung sowie die Radon-Therapie sind beides klinisch erprobte Methoden, die einfach anzuwenden sind und nur sehr geringe Nebenwirkungen aufweisen [1, 3, 9, 12]. Trotz der guten klinischen Erfahrungen mit dieser Methode ist bis jetzt nur sehr wenig über die molekularen und zellulären Hintergründe dieser Therapie bekannt. Ein besseres Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen würde Möglichkeiten zur Verbesserung der Therapie ermöglichen. So könnte zum Beispiel die Höhe der applizierten Dosis sowie die Anzahl der Fraktionen variiert werden. Auch der Einsatz von alternativen Strahlungsarten wie z.B. beschleunigte Ionen oder Protonen könnte durch ein verbessertes Verständnis ermöglicht werden.

Die Zielsetzung dieser Arbeit bestand daher in der Untersuchung molekularer und zellulärer Mechanismen, die für die anti-entzündliche Wirkung der Niedrig-Dosis-Strahlentherapie von Bedeutung sein könnten. Außerdem sollte die Wirksamkeit dünn-ionisierender Photonenstrahlung mit dicht-ionisierender Teilchenstrahlung verglichen werden. Die inhomogene Dosisverteilung von Teilchenstrahlung bedeutet auf zellulärer Ebene, dass bei niedrigen, Therapie-relevanten Dosen nur relativ wenig Zellen getroffen werden, dafür aber eine relativ hohe Dosis erhalten. Wohingegen bei Photonenstrahlung alle Zellen die gleiche niedrige Dosis erhalten.

Auf der Grundlage der bisherigen Arbeiten zu diesem Thema sollten die Experimente im Wesentlichen auf folgende biologische Endpunkte eingeschränkt werden: Freisetzung von Zytokinen als ein zentraler regulatorischer Schritt bei entzündlichen Prozessen, Induktion von strahleninduzierter Apoptose und anschließender Phagozytose sowie die Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen, wie sie die Blutgefäßwände auskleiden, um die Transmigration von Leukozyten an Entzündungsorte zu ermöglichen.

In bisher vorliegenden Studien zur Wirkung von Photonen im Niedrigdosis-Bereich auf Adhäsionsprozesse wurden ausschließlich immortalisierte Endothelzellen verwendet [24, 36]. Aus diesem Grund

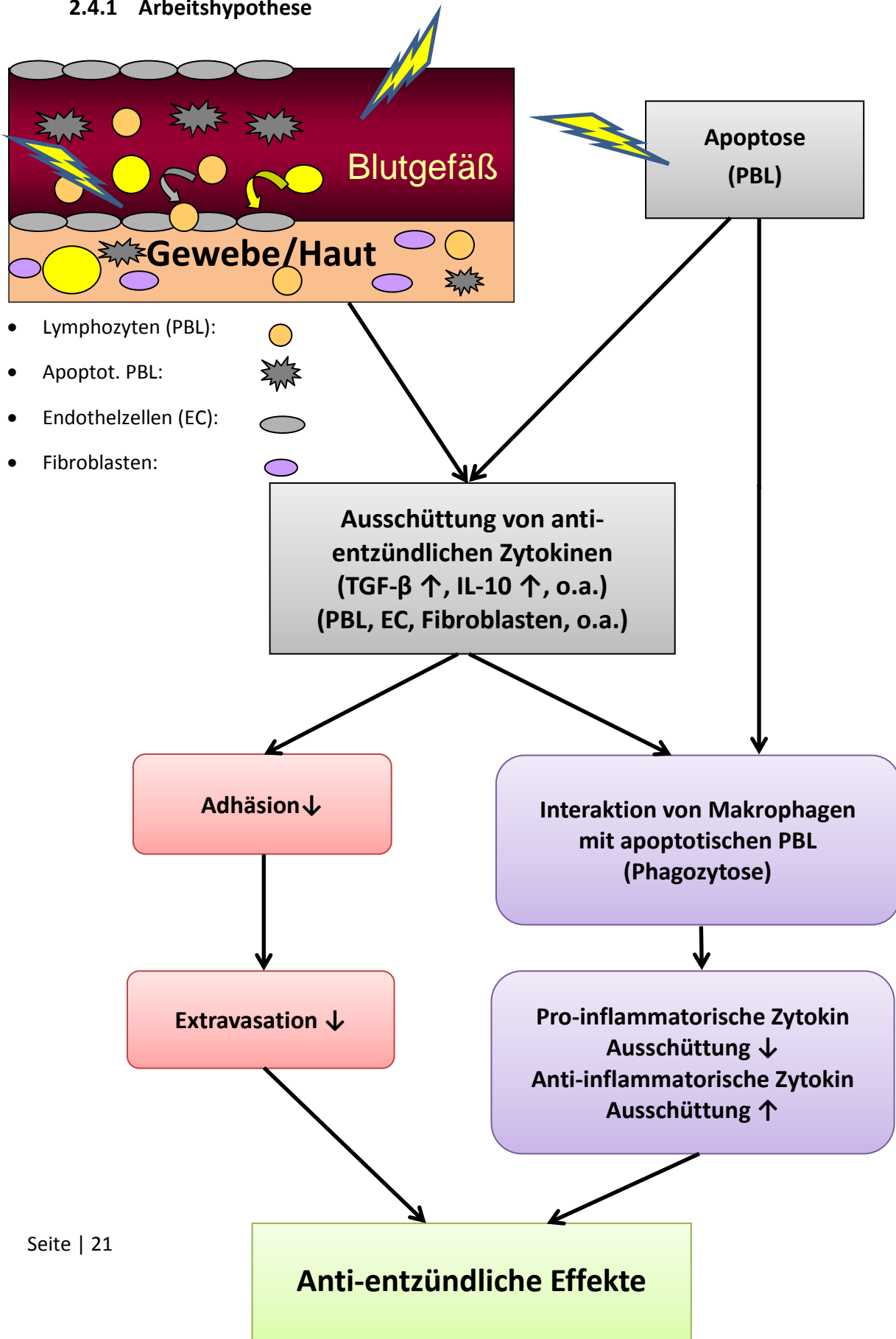
sollte in dieser Arbeit die Beeinflussung von Adhäsion durch Röntgen- und Teilchenstrahlung vor allem für primäre Endothelzellen untersucht werden.

Es ist bisher bekannt, dass Leukozyten, in denen durch UV-Strahlung, Hitzebehandlung oder in Gegenwart von Induktoren Apoptose induziert worden war, aktivierte Makrophagen so beeinflussen, dass diese nach der Phagozytose der apoptotischen Zellen entzündungshemmende Zytokine freisetzen [37–40]. Hier sollte eine entsprechende Wirkung für Röntgen- und Teilchenstrahlung überprüft werden.

Zusätzlich wurde die Wirkung der Radon-Therapie *in vivo* in Blutproben verfolgt, indem das Auftreten von Apoptose und die Freisetzung von Zytokinen untersucht wurden.

Dabei wurde zu Beginn dieser Arbeit hypothetisch davon ausgegangen, dass in der Niedrig-Dosis-Therapie durch strahleninduzierte Apoptose sowohl Phagozyten als auch andere umliegende Zellen zur Freisetzung von anti-entzündlichen Zytokinen angeregt werden. Dies könnte lokal und auch systemisch eine bestehende Entzündung unterdrücken, wie durch eine verminderte Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen, was wiederum zu einer Verringerung der Extravasation führt. Letztlich könnten diese strahleninduzierten Vorgänge zur klinisch beobachteten Hemmung der bestehenden chronischen Entzündung und Schmerzlinderung beitragen, die in den betroffenen Gelenken die Beweglichkeit wieder erhöht.

2.4.1 Arbeitshypothese



3 Material und Methoden

Für die hier beschriebenen Experimente werden im Anhang die verwendeten Materialien und Verbrauchslösungen in der Chemikalienliste aufgeführt. Die Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sterilbank durchgeführt. Die Glaspipetten wurden vor Gebrauch bei 160°C für 2h bei trockener Hitze, Plastikware bei 121°C und 2bar Dampfdruck für 20Min. im Autoklav sterilisiert. Zum Ansetzen der Lösungen wurde Reinstwasser aus einer Umkehrosmoseanlage (Millipore GmbH) verwendet.

3.1 Zellkultivierung

3.1.1 Kultivierungsbedingungen

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden alle unter Standardbedingungen [41] im Brutschrank kultiviert. Die Zellen wurden bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit in Zellkulturflaschen (T12,5-T75) sowie in Petrischalen (Ø 3,5cm) kultiviert. Der Füllstand in den Zellkulturflaschen betrug jeweils 2mm, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu gewährleisten. Ausgenommen waren hierbei Suspensionskulturen von Lymphozyten die mit einem Füllstand von bis zu maximal 5,3mm kultiviert wurden.

3.1.2 Zellzahlbestimmung

Für die Zellzahlbestimmung wurde ein elektronisches Zellanalysegerät (Casy 1, Schärfe System GmbH) verwendet. Hierfür wurden die Zellen in einer isotonen Lösung (CASYton) verdünnt. Im Gerät wurden die Zellen durch eine Kapillare gesaugt, beim Durchtritt einer Zelle verändert sich der elektrische Widerstand in der Kapillare. Je größer die Zelle ist, desto größer ist auch die Widerstandsänderung. Somit wird eine Bestimmung der Zellzahl und der Zellgröße ermöglicht.

3.1.3 Trypanblaufärbung

Zur Bestimmung des Anteils lebender Zellen in einer Population wurde die Trypanblau-Exklusionsmethode verwendet. Der Farbstoff Trypanblau kann Zellmembranen nicht durchdringen und färbt somit nur tote Zellen ohne intakte Zellmembran. Tote Zellen erscheinen blau im Lichtmikroskop und können somit von den lebenden Zellen unterschieden werden. Zur Färbung wurden ca. 10⁵ Zellen 1x mit PBS^{-/-} gewaschen und anschließend in einer 0,04% Trypanblau-Färbelösung resuspendiert und direkt im Anschluss mit einer Thoma Zählkammer am Lichtmikroskop ausgezählt. Wobei mindestens 4 Großquadrate ausgezählt wurden.

3.1.4 Zellkultivierung Endothelzellen

3.1.4.1 Hybrid-Endothelzelllinie (EA.hy.926)

Als Modellsystem für Endothelzellen sowie für Etablierungsarbeiten wurde die immortale Hybrid-Endothelzelllinie EA.hy.926 verwendet. Die Zelllinie wurde durch die Fusion von humanen Endothelzellen der Nabelschnur (*human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC) und der permanenten, humanen Zelllinie A549 -isoliert aus einem Lungenkarzinom- gewonnen [42]. Die Zellen weisen in ihrem Phänotyp einige Gemeinsamkeiten mit HUVEC auf und können daher als Modellsystem für Endothelzellen verwendet werden [42]. Die Zellen wurden freundlicherweise von Dr. Franz Rödel (Goethe Universität Frankfurt) zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in DMEM, +10% FCS, +10mM HEPES und +1% Natriumpyruvat. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage, die Subkultivierung ab einer Konfluenz von ca. 95% alle 7 Tage. Da es sich bei den Zellen um gentechnische veränderte Organismen (GVO) der Sicherheitsstufe 1 handelt, sind im Umgang mit den Zellen die entsprechenden Gentechnik-Sicherheitsverordnungen einzuhalten.

3.1.4.2 Primäre Endothelzellen

Um einen näheren Bezug zur Situation *in-vivo* herzustellen wurden außer der Hybrid-Endothelzelllinie auch primäre Endothelzellen verwendet. Alle primären Endothelzellen wurden von der Firma Lonza S.p.r.l., Verviers (Belgien) bezogen. In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Zelltypen verwendet: HUVEC, HPAEC (*human pulmonary aorta endothelial cells*) und HMVEC (*human microvascular endothelial cells*). HPAEC und HMVEC wurden ausgewählt, da sie aus den Geweben der Lunge bzw. Haut stammen. Organe, die bei einer Radon-Behandlung einer Strahlenbelastung ausgesetzt sind. HUVEC und HPAEC wurden in EGM (*endothelial growth medium*) von Lonza kultiviert (Zusammensetzung siehe Chemikalienliste). HMVEC wurden in EGM2-*microvascular*(MV) ebenfalls von Lonza kultiviert, der Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage. Da die Zellen durch einen autokrinen Mechanismus unter statischen Bedingungen schneller ausdifferenzieren bzw. altern [43] wurden die Zellen nur bis zu einer CPD (*cumulative population doubling*) von maximal 20 verwendet.

3.1.4.3 Subkultivierung Endothelzellen

Zum Passagieren der EA.hy.926 Zellen wurde zunächst das Medium abgesaugt. Dann wurde 1x mit 1-3ml Trypsin_H gewaschen (je nach Größe des Zellkulturgefäßes) und anschließend erneut 1-3ml Trypsin_H zugegeben und die Zellen für 8Min. im Brutschrank inkubiert. Nach der vollständigen Ablösung der Zellen wurde das Trypsin durch Zugabe von 4-12ml Medium inaktiviert. Die Subkultivierung der primären Endothelzellen erfolgte nach einem ähnlichen Protokoll. Hier wurden die Zellen zunächst 1x mit 5ml PBS^{-/-} gewaschen. Danach wurden 1-4ml Accutase zugegeben und die Zellen für 8Min. im Brutschrank inkubiert. Nach der vollständigen Ablösung der Zellen wurde die Accutase durch Zugabe von 4-11ml Medium inaktiviert. Im Anschluss wurde jeweils die Zellzahl mittels eines

elektronischen Zellzählgeräts (CASY TT, Schärfe System) bestimmt. Die Zellen wurden anschließend mit einer Einsaatdichte von $6 \cdot 10^4$ Zellen/cm² in Zellkulturgefäße eingesät.

3.1.4.4 Altersbestimmung der Zellen

Um eine Vergleichbarkeit bezüglich des Differenzierungsstatus der Zellen zu gewährleisten, wurde nach jeder Passage die kumulative Populationsverdopplung (*cummulative population doublings*, CPD) berechnet. In den hier beschriebenen Experimenten wurden nur Zellen mit einer CPD bis maximal 20 verwendet. Für die Berechnung wird die Anzahl der eingesäten Zellen (N_0), die gesamte Zellzahl (N) und die Anheftungseffizienz (AE) benötigt. Die Berechnung erfolgt nach folgender Formel:

$$CPD_{neu} = CPD_{alt} + \left(\frac{\ln \left(\frac{N}{N_0 * AE} \right)}{\ln 2} \right)$$

-Formel 2-

3.1.5 Isolierung und Kultivierung peripherer Blutleukozyten

Die in dieser Arbeit verwendeten Leukozyten (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) wurden aus peripherem Blut isoliert. Bei den Blutproben handelte es sich um sogenannte *Buffy-coats*, die von der Blutspendebank Frankfurt/Main (DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg/Hessen) bezogen wurden. Ein *Buffy-coat* ist ein antikoaguliertes Leukozytenkonzentrat, welches durch Filtration einer Blutspende gewonnen wird. Die freiwilligen Spender waren zwischen 18 und 59 Jahren alt und sowohl männlichen als auch weiblichen Geschlechts. Die *Buffy-coats* waren zum Zeitpunkt der Aufarbeitung ca. 24 Stunden alt. PBMC sind zelluläre Bestandteile des Blutes, die auch als „weiße Blutkörperchen“ bezeichnet werden. Sie bestehen aus folgenden Subtypen: Lymphozyten (*peripheral blood lymphocytes*, PBL), Monozyten und Granulozyten. PBL machen etwa 20-40% der PBMC aus, Monozyten etwa 2-10% und Granulozyten etwa 50-70% [44]. PBL sind eine heterogene Gruppe aus verschiedenen Zelltypen, die sich in T-, B-Lymphozyten und *natural-killer*-Zellen (NK-Zellen) unterteilen lässt. PBL sind ein wichtiger Bestandteil des erworbenen Immunsystems und sind für die Erkennung und Beseitigung von Fremdkörpern verantwortlich. Periphere Blut-Monozyten sind die Vorläuferzellen von Gewebsmakrophagen. Monozyten und Makrophagen sind Teil des angeborenen Immunsystems. Sie werden im weißen Knochenmark aus myelomonocytischen Stammzellen gebildet und werden nach der Differenzierung zu Monozyten ins Blut abgegeben. Dort zirkulieren sie bis zu 2 Tage, bis sie ins Gewebe migrieren und dort zu gewebsspezifischen Makrophagen ausdifferenzieren [19].

3.1.5.1 Isolierung von peripheren Blut-Lymphozyten/-Monozyten

Die Isolierung der peripheren Blut-Lymphozyten/-Monozyten aus einem *Buffy-coat* erfolgte nach folgendem Protokoll: Zunächst wurde der Inhalt des *Buffy-coats* in sterile 50ml Zentrifugenröhrchen

überführt und 1:1 mit kaltem PBS^{+/+} +2mM EDTA verdünnt. Es wurden 15ml Ficoll (Dichte = 1,077g/ml) in Zentrifugenröhrchen gegeben und mit jeweils 33ml der Buffy-coat Zellsuspension überschichtet und anschließend bei 1300g (ohne Bremse) für 35Min. zentrifugiert. Durch die Zentrifugation erfolgte eine Auftrennung der Bestandteile der Zellsuspension. Die Leukozyten sammelten sich hierbei, aufgrund ihrer geringeren Dichte als das Ficoll, in der Interphaseschicht zwischen Plasma und Ficoll. Im Plasma befanden sich die Thrombozyten. Die Erythrozyten und die Granulozyten befanden sich im Sediment am Boden des Zentrifugenröhrchens, da sie eine höhere Dichte als das Ficoll haben. Die Interphaseschicht wurde vorsichtig mit einer Pipette entnommen um Verunreinigungen durch Ficoll oder Plasma/Thrombozyten zu vermeiden. Anschließend wurden die Leukozyten 4x mit je 50ml kaltem PBS^{+/+} +2mM EDTA gewaschen. Die Zentrifugationsschritte waren folgendermaßen unterteilt: 1x 680g/10Min., 1x 300g/10Min., 2x 200g/10Min. Das Plasma wurde ebenfalls abgenommen und für 30Min. bei 56°C hitzeinaktiviert. Im Anschluss wurde das Plasma 2x bei 3000g/5Min. abzentrifugiert. Die Leukozyten wurden nach den Waschschritten im Separations-Medium (X-Vivo15, +1% Penicillin/Streptomycin (P/S), +1,5% autologes, hitzeinaktiviertes Plasma) in Zellkulturgefäßen für 1,5 Stunden im Brutschrank inkubiert. Außerdem wurde die Zellzahl bestimmt und eine Trypanblaufärbung durchgeführt. Die Zellen wurden nur weiterverwendet, wenn der Anteil an lebenden Zellen >95% war. Während der Inkubation adhären die Monozyten an der Plastikoberfläche der Zellkulturgefäße, die PBL verbleiben im Überstand. Nach der Inkubation wurde der Überstand abgenommen und die Monozyten 2x mit warmem PBS^{-/-} gewaschen um noch verbliebene PBL abzuwaschen. Die Monozyten wurden anschließend in Makrophagen Medium (X-Vivo15, +1% P/S, +10% FCS_S, inakt.) kultiviert. Die PBL im Überstand wurden abzentrifugiert (200g/10Min.), in PBMC-Medium (RPMI 1640, 1% P/S, +20% hitzeinaktiviertes FCS_S, +10mM HEPES) kultiviert und eine erneute Zellzahlbestimmung durchgeführt.

3.1.5.2 Kultivierung/Differenzierung von Monozyten/Makrophagen

Für die Experimente mit humanen Monozyten/Makrophagen wurden je zwischen $1-1,5 \times 10^6$ Leukozyten/cm² ausgesät. Die Kultivierung der Monozyten erfolgte in Monozyten-Medium (RPMI 1640, +1% P/S, +10% hitzeinaktiviertes FCS_S, +10mM HEPES) für 24-48 Stunden. Die Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen erfolgte in Makrophagen-Medium über einen Zeitraum von 7 Tagen. Es wurden drei verschiedene Differenzierungsbedingungen angewendet:

1. Die spontane Differenzierung ohne eine zusätzliche Stimulierung.
2. Eine Differenzierung durch Stimulation mit M-CSF (*macrophage colony stimulating factor*) [20-50ng/ml].
3. Eine Differenzierung durch Stimulation mit GM-CSF (*granulocyte/macrophage colony stimulating factor*) [100ng/ml].

Sowohl M-CSF als auch GM-CSF können zur in-vitro Differenzierung von Monozyten in Makrophagen verwendet werden [27].

3.2 Bestrahlung

Die Bestrahlung der Zellen erfolgte an den Bestrahlungseinrichtungen des GSI Helmholtzzentrums für Schwerionenforschung in Darmstadt. Die Zellen wurden je nach Experiment 2-7 Tage vor der Bestrahlung in die jeweiligen Zellkulturgefäße eingesät. Die Bestrahlung der Zellkulturen erfolgte im jeweiligen Kultivierungs-Medium. Direkt nach der Bestrahlung wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. In jedem Bestrahlungsexperiment wurden unbestrahlte Kontrollen mitgeführt, die den gleichen Bedingungen bei Transport und Lagerung ausgesetzt waren.

3.2.1 Bestrahlung mit Röntgenstrahlung

Die Röntgenbestrahlung der Zellen erfolgte mit einer Röntgenröhre (Isovolt DS1, Seifert). Die Beschleunigungsspannung betrug 250kV und der Kathodenstrom 16mA. Damit lag die Energie der Elektronen bei bis zu 250keV und der LET betrug ca. 2keV/ μ m. Im Austrittsfenster der Röntgenstrahlung war ein Filtersystem bestehend aus 7mm Beryllium, 1mm Aluminium und 1mm Kupfer installiert, welches die langwelligen Anteile der Röntgenstrahlung absorbierte. Die Dosis und die Dosisleistung wurden mit einem Dosimeter (SN4, PTW-Freiburg) bestimmt. Die Dosisleistung betrug in allen Experimenten 2Gy/Min. und die applizierten Dosen lagen zwischen 0,1 und 12Gy.

3.2.2 Bestrahlung mit Kohlenstoffionen

3.2.2.1 Niederenergetische Kohlenstoffionen

Die Bestrahlung mit niederenergetischen Kohlenstoffionen erfolgte am Linearbeschleuniger UNILAC. Die Energie der Ionen betrug beim Auftreffen auf die Zellen 9,9 MeV/u und der LET betrug 168keV/ μ m. Für die Bestrahlung am UNILAC wurden die Zellen in Petrischalen (\varnothing 3,5cm) eingesät. Die Proben wurden kurz vor der Bestrahlung in senkrechter Position in ein mit Grundmedium (ohne FCS) gefülltes Plexiglas Magazin gestellt und für den Transport der Zellen zur biologischen Bestrahlungsanlage (BiBa) verschlossen. In der BiBa wurden die Petrischalen mittels eines pneumatischen Greifarms in den Strahlengang gehoben. Die Dosimetrie erfolgte durch eine am Austrittsfenster befestigte Ionisationskammer. Der Dosisbereich in den hier beschriebenen Bestrahlungsexperimenten lag zwischen 0,1-2Gy (Fluenzbereich: $0,8-8 \times 10^6$ T/cm²).

3.2.2.2 Hochenergetische Kohlenstoffionen

Da die Bestrahlung von Suspensionskulturen an der Bestrahlungseinrichtung am UNILAC nur mit größeren Einschränkungen möglich war, wurden Suspensionskulturen nur mit hochenergetischen Kohlenstoffionen am Schwerionensynchrotron (SIS) bestrahlt. Die Bestrahlung erfolgte in 5ml Röhrchen mit einem Innendurchmesser von 10mm [45]. Die Röhrchen wurden in einen speziellen Halterungsblock (Abb. 6) gestellt, um sie exakt im Strahlengang positionieren zu können. Die Proben wurden mit einem ausgedehnten Bragg Peak (25mm Breite) bestrahlt. Der ausgedehnte Bragg Peak wurde durch

eine Energievariation der Ionen erzeugt. Der Energiebereich lag zwischen 114-158MeV/u, der LET zwischen 60-85keV/ μm . Der Teilchenstrahl wurde mittels eines intensitätsmodulierten Rasterscan-Verfahrens über die Proben gelenkt [46]. Während der Bestrahlung wurde der Strahl durch Detektoren kontrolliert, welche die freigesetzten Gamma-Quanten detektieren, die beim Zerfall des Kohlenstoffisotops freigesetzt werden. Für die Dosimetrie wurden kalibrierte Ionisationskammern verwendet [47]. In den Bestrahlungsexperimenten wurden folgende Dosen verwendet: 0,5; 1; 2Gy die korrespondierenden Fluenzen lagen bei: 4,31; 8,61; $17,2 \times 10^6 \text{ T/cm}^2$.

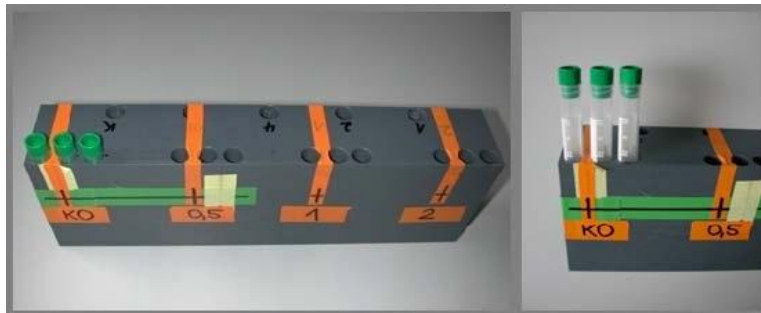


Abb. 6: Halterungsblock mit 5ml Röhrchen für die Bestrahlung mit einem ausgedehnten Bragg-Peak.

3.2.3 Bestrahlung mit Stickstoffionen

Die Bestrahlung mit monoenergetischen Stickstoffionen erfolgte ebenfalls am SIS. Die Ionen hatten beim Auftreffen auf den Zellen eine Energie von 130MeV/u und einen LET von 70keV/ μm . Durch die monoenergetischen Ionen war eine Bestrahlung mit einem ausgedehnten Bragg-Peak nicht möglich, deswegen erfolgte die Bestrahlung der Zellen nicht mit den gleichen Methoden wie für die Bestrahlung mit Kohlenstoffionen. Adhärenenten Zellkulturen wurden in T12,5 Flaschen bestrahlt, die komplett mit serumfreiem Medium gefüllt waren und senkrecht im Strahlengang positioniert wurden. Die Bestrahlung von Suspensionskulturen erfolgte in speziellen Polyethylen-Kammern [48]. Die Kammern (Abb. 7) hatten einen Innendurchmesser von 2mm und ein Volumen von 4ml. Die Wanddicke betrug 1mm. Die Kammern wurden vor dem Einsatz mit Ethanol und anschließender UV-Bestrahlung sterilisiert. Mit einem 6 x 10cm großen Bestrahlungsfenster wurde die komplette Fläche der Kammer bestrahlt. Die Ablenkung des Teilchenstrahls erfolgte ebenfalls mit dem Rasterscan-Verfahren. Der Dosisbereich lag zwischen 0,1 und 2Gy.



Abb. 7: Polyethylen-Kammern für Bestrahlung von Suspensionskulturen mit monoenergetischen Stickstoffionen (130MeV/u).

3.2.4 Bestrahlung mit UV-B Strahlung

Die Bestrahlung mit UV-B Strahlung wurde mit dem Biolink-BLX *Crosslinker* (PEQLAB Biotechnologie GmbH) durchgeführt. Das Gerät verfügte über 5 UV-B Leuchtröhren, sowie ein internes Dosimeter. Das Spektrum der Leuchtröhren reichte von 280-370nm und hatte somit auch einen geringen, allerdings zu vernachlässigenden UV-A Anteil. Die Bestrahlung erfolgte mit einer Dosis von 180mJ/cm². Für die Bestrahlung wurde das jeweilige Zellkulturmedium durch PBS^{-/-} ersetzt, da im Medium Photosensibilisatoren enthalten sind, die über die Bildung von ROS die Strahlenschäden verstärken können. Direkt nach der Bestrahlung wurden die Zellen wieder mit frischem Medium versetzt und im Brutschrank inkubiert.

3.3 Analyse der Leukozyten Populationen

3.3.1 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie ist es möglich die Fluoreszenzintensität sowie die Streulichteigenschaften einzelner Zellen in Suspensionen in einem Durchflusssystem zu bestimmen. Die Zellen werden hierfür durch spezifische fluoreszenzmarkierte Antikörper oder direkt durch fluoreszierende Farbstoffe angefärbt. Die Technik erlaubt die Analyse mehrerer Tausend Zellen innerhalb weniger Minuten. In den hier beschriebenen Experimenten wurde das Durchflusszytometer PAS-III der Firma Partec verwendet. Zur Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe wurde ein Argon-Laser (Wellenlänge: 488 nm) sowie eine Quecksilberlampe verwendet. Das Gerät ist in der Lage mehrparametrische Messungen durchzuführen, wodurch die simultane Detektion mehrerer Fluoreszenzsignale möglich ist. Durch die Auftragung der gemessenen Daten in zweidimensionalen Histogrammen lassen sich Zellpopulationen aufgrund ihrer Emissionsparameter charakterisieren. In den Histogrammen kann man durch das Setzen von sogenannten *Gates*⁵ bestimmte Zellpopulationen auswählen, die dann für eine weitere Auswertung verwendet werden können. Diese Technik wird als *gaten* bezeichnet. Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit der von Partec mitgelieferten Software: Flowmax (Vers. 2.56, Quantum Analysis GmbH).

3.3.2 Reinheitsbestimmung der Leukozyten-Populationen

Um die Versuche mit PBL und Monozyten/Makrophagen unter möglichst standardisierten Bedingungen durchführen zu können, wurde die Reinheit der jeweiligen Population nach der Trennung von PBL und Monozyten durch die Adhärenzmethode⁶ mittels einer Immunfärbung mit verschiedenen Antikörpern bestimmt. Die Antikörperfärbungen wurden direkt nach der einstündigen Inkubation für das Adhärenzverfahren durchgeführt. Es wurden hierbei Antikörper (R&D Systems Inc., Miltenyi

⁵ Bereichen

⁶ Siehe Kapitel 3.1.5.1

Biotec GmbH) gegen spezifische Membranproteine von PBL (CD3, CD19) und Monozyten (CD14) verwendet. CD3 ist ein Oberflächenmolekül, das ausschließlich auf adulten T-Lymphozyten sowie auf einer Untergruppe der NK-Zellen vorkommt. Das Oberflächenmolekül CD19 wird in B-Lymphozyten gebildet. CD14 ist ein Rezeptor auf Monozyten und Makrophagen und ist für die Erkennung von Lipopolysacchariden (LPS) verantwortlich. Die verwendeten Antikörper (Maus-IgG1: CD3, 14 und 19) waren mit unterschiedlichen Farbstoffen gekoppelt: Fluoreszein (FITC: CD14 Abs./Em.: 490/510nm), Phycoerythrin (PE, CD3+CD19 Abs./Em.: 495/575nm).

Für die Färbung der Oberflächenmoleküle wurden 10^6 Zellen zunächst abzentrifugiert (200g, 10Min.), dann 1x mit PBS^{-/-} gewaschen und danach erneut abzentrifugiert (200g, 10Min.). Adhärenente Monozyten wurden vor dem Waschschrift mit einem Zellschaber abgelöst. Um eine unspezifische Bindung des Antikörpers an den Fc-Rezeptor von B-Lymphozyten und Monozyten zu verhindern, wurden die Zellen zunächst in 90µl PBS^{-/-} +0,5%BSA +2mM EDTA +10µl *FcR-Blocking-Reagent* (Miltenyi Biotec GmbH) resuspendiert und für 10Min. bei 4°C inkubiert. Im Anschluss wurden je 10-25µl des entsprechenden Antikörpers zugeben und erneut für 10-30Min. bei 4°C inkubiert. Um die durch unspezifische Bindungen verursachte Autofluoreszenz zu bestimmen, wurde in jedem Experiment zur Kontrolle ein Isotyp-Antikörper verwendet. Dieser Antikörper ist vom selben Typ wie der zur Färbung verwendete Antikörper. Er ist mit dem gleichen Farbstoff gekoppelt, jedoch nicht gegen humane Proteine gerichtet, und kann somit nicht spezifisch an humane Zellen binden. Danach wurden die Zellen noch 1x mit PBS^{-/-} gewaschen und dann direkt im Durchflussszytometer gemessen.

Eine beispielhafte Auswertung ist in Abb. 8 dargestellt. In Histogramm 1 wurde das Forwardscatter (FSC)- gegen das Sidescatter (SSC)-Signal aufgetragen. Durch das Setzen von Gate R1 wurde die Population der Leukozyten von vorhandenen Zellfragmenten bzw. -Aggregaten abgetrennt. In Histogramm 2 und 3 wurde das SSC gegen das Fluoreszenzsignal des jeweiligen Farbstoffs aufgetragen. Durch das Setzen der Quadranten Q2 und Q4 konnte die gefärbte von der ungefärbten Fraktion getrennt werden. Die in Histogramm 2 abgebildete Messung wurde mit Zellen durchgeführt, die mit dem Isotyp-Antikörper behandelt wurden. Die Messung in Histogramm 3 wurde mit Zellen durchgeführt, die mit den Antikörpern gegen die jeweils entsprechenden Leukozytenmarkern behandelt wurden. Durch den Quadranten Q2 wurde die Größe der jeweiligen Leukozytenfraktion bestimmt.

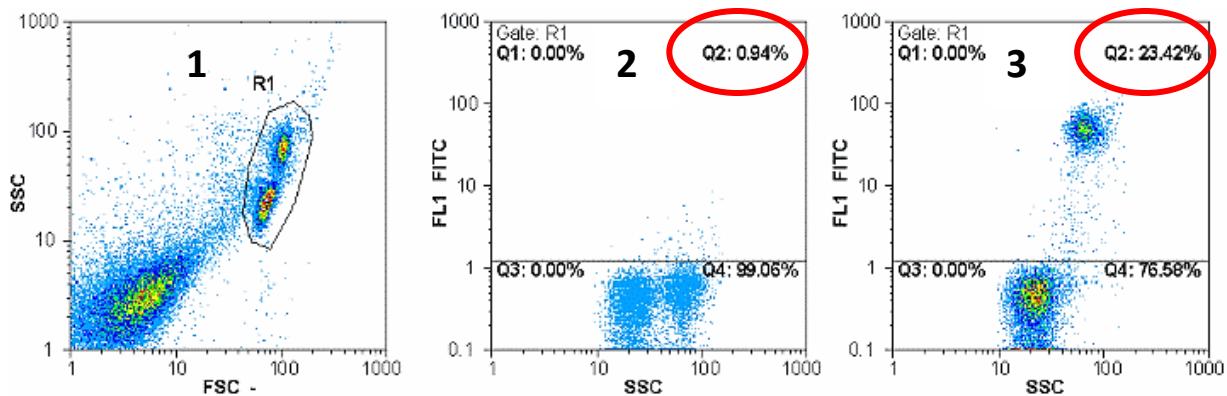


Abb. 8: Prinzip der Analyse der Leukozyten-Population im Durchflusszytometer. (1) FSC/SSC Plot zum identifizieren der Leukozytenpopulation (Gate R1). (2) SSC/FL1 Plot der Isotyp-Kontrolle zur Bestimmung der Auto-fluoreszenz (Quadrant Q2+Q4). (3) SSC/FL1 Plot der gefärbten Probe zu Bestimmung Größe der Populations-fraktion (Quadrant Q2+Q4).

Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente sind in Tab. 1 aufgelistet. Da die Reinheit der einzelnen Fraktionen je nach Spender variierte, wurde in der Tabelle der aus den Experimenten resultierende Bereich für die jeweilige Fraktion angegeben.

Zunächst wurde die Zusammensetzung der Leukozytenpopulation vor der Abtrennung der Monozyten bestimmt. Der Anteil an $CD3^+$ Zellen innerhalb der Leukozytenpopulation lag zwischen 50-70%, der Anteil an $CD14^+$ zwischen 10-20% und der Anteil der $CD19^+$ zwischen 5-10%. Nach der Abtrennung der Monozyten durch das Adhärenzverfahren konnte der Anteil an $CD3^+$ Zellen in der PBL-Fraktion auf ca. 65-80% gesteigert werden. Der Anteil an $CD19^+$ Zellen lag weiterhin zwischen 5-10%, während der Anteil an $CD14^+$ Zellen auf ca. 3-6% reduziert wurde.

Die Reinheit der Monozyten-Population wurde ebenfalls direkt nach Abtrennung der PBL bestimmt. Zu Beginn der Experimente wurde während der Inkubation für die Abtrennung der Monozyten RPMI 1640 Medium verwendet mit einem Zusatz von 10% hitzeinaktiviertem FCS. Allerdings war die Ausbeute an adhärenenten Monozyten bei Verwendung dieses Medium nur sehr gering. Aus diesem Grund wurde die Zusammensetzung des Mediums verändert. Für die Abtrennung der Monozyten wurde dann X-Vivo 15 Medium mit einem Zusatz von 1,5% hitze-inaktiviertem, autologem Serum verwendet.

Nach der Abtrennung der PBL durch das Adhärenzverfahren konnte die Reinheit der Monozyten-Population ($CD14^+$) auf ca. 70-80% erhöht werden. Der Anteil der PBL-Population ($CD3+CD19$) wurde auf ca. 2-4% bzw. 1-2% reduziert.

Tabelle 1: Reinheit der verschiedenen Leukozyten-Populationen

Leukozyten-Population	T-Lymphozyten (CD3 ⁺)	Monozyten (CD14 ⁺)	B-Lymphozyten (CD19 ⁺)
PBMC vor Auftrennung	50-70%	10-20%	5-10%
PBL nach Auftrennung	65-80%	3-6%	5-10%
Monozyten nach Auftrennung	2-4%	70-80%	1-2%

Tab. 1: Reinheit der verschiedenen Leukozyten-Populationen vor und nach der Auftrennung der PBL und Monozyten durch die Adhärenzmethode.

3.3.3 Überprüfung der Makrophagen-Differenzierung

Um die Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen zu überprüfen, wurde eine morphologische Begutachtung der Zellen durchgeführt. Während Monozyten eine kleine, runde Morphologie aufweisen, haben Makrophagen eine größere, runde oder längliche Form, die einerseits durch eine Vergrößerung des Zellvolumens und andererseits durch die Ausbildung von Pseudopodien entsteht. Somit lassen sich Monozyten klar von Makrophagen unterscheiden. Hierzu wurden zu Beginn der Kultivierung Fotos der frisch eingesäten Monozyten gemacht und dann nach 7 Tagen nochmals Fotos von den ausdifferenzierten Makrophagen. Die Fotos sind in Abb. 9 dargestellt. Da sehr viele verschiedene Makrophagen Subtypen im Körper vorkommen, gibt es keinen einheitlichen Marker, der auf allen Makrophagen vorkommt. Aus diesem Grund wurde die Bestimmung der Makrophagen in dieser Arbeit nicht durch eine Immunfärbung durchgeführt, sondern morphologisch. Nach der 7 tägigen Kultivierungsdauer waren ca. 90% der Zellen zu Makrophagen ausdifferenziert. Die Stimulierung mit M-CSF bzw. GM-CSF steigerte diesen Anteil nochmals.

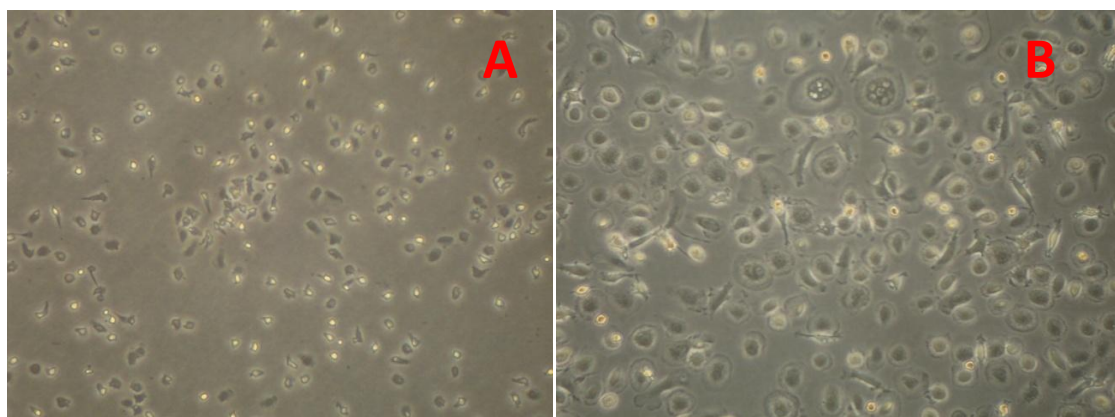


Abb. 9: Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen. **(A)** Monozyten nach 1 Stunden Inkubation im Brutschrank und Abtrennung der PBL. **(B)** Makrophagen nach 7 Tagen Kultivierung. **(Vergrößerung: 200x)**

3.4 Untersuchung der Adhäsion von PBL an Endothelzellen

Für die Untersuchung des Adhäsionsverhaltens von PBL an Endothelzellen sowie einer möglichen Beeinflussung der Adhäsion durch ionisierende Strahlung [24], wurde ein experimentelles Modellsystem etabliert, welches eine Quantifizierung der Adhäsion von markierten PBL ermöglichte (Abb. 10). Hierbei wurde zunächst ein System mit statischen Kultivierungsbedingungen verwendet. Um die Kultivierungsbedingungen mehr an die Situation *in vivo* anzugleichen, wurde im weiteren Verlauf der Arbeit ein System mit dynamischen Kultivierungsbedingungen etabliert.

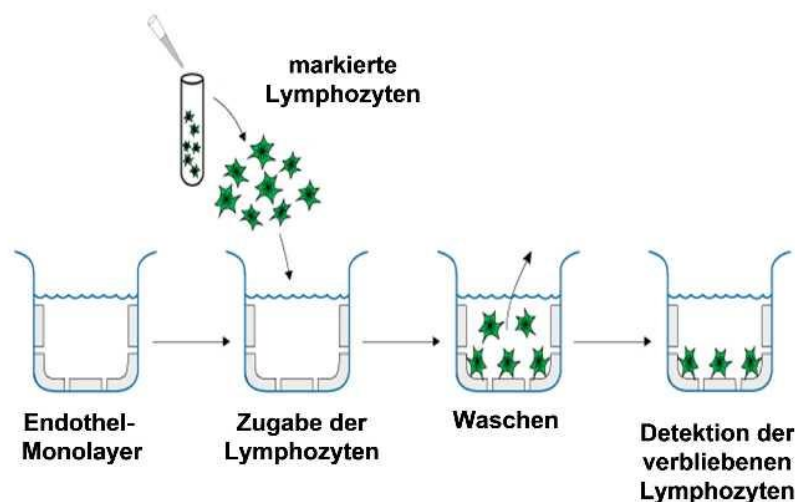


Abb. 10: Prinzip des Adhäsionstests: 1. Ausbildung eines konfluenten Endothel-Monolayers. 2. Bestrahlung und Stimulation der Endothelzellen [TNF- α (1-10 μ g/ml)] 3. Inkubation, 24 Stunden/37°C 4. Zugabe von markierten PBL 30Min./37°C 5. Waschschrte 6. Detektion am Fluoreszenzmikroskop oder am Durchflusszytometer.

3.4.1 Markierung der PBL

In dieser Arbeit wurden 2 verschiedene Methoden zur Markierung der PBL verwendet. Für die Durchflusszytometrische Quantifizierung wurden die Zellen mit einem Membranfarbstoff (PKH67) gefärbt. Für die mikroskopische Quantifizierung wurden die PBL mit Biotin markiert.

3.4.1.1 Biotin Markierung

(+)-Biotin N-hydroxysuccinimid Ester (Sigma) dient als Kopplungsmolekül. Es bindet an die Amino-
gruppen von Proteinen und kann dann mit Hilfe eines Streptavidinkonjugats quantifiziert werden. Das Streptavidin von *Streptomyces avidinii* ist ein Protein mit 4 Untereinheiten(UE), es bindet mit sehr hoher Affinität jeweils ein Molekül Biotin pro UE. Durch die Kopplung eines Farbstoffs (Cy3 oder FITC) an das Streptavidin können die Biotin-markierten Zellen im Fluoreszenzmikroskop detektiert und von den Endothelzellen unterschieden werden. Die Markierung erfolgte nach folgendem Protokoll: Zunächst wurden 2,5x10⁷ PBL in ein 50ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 200g für 10Min. abzentrifugiert. Danach wurden die Zellen in 5ml PBMC-Medium resuspendiert und 100 μ l der

Biotin-Stammlösung (10mg/ml) hinzugegeben. Es folgte eine Inkubation für 15Min. auf Eis. Im Anschluss erfolgte eine erneute Zentrifugation (200g, 10Min.) und der Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden in 0,5ml 1M Ammoniumchlorid resuspendiert, sofort in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und mit 14,5ml PBS^{-/-} versetzt. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (200g, 10Min.) sowie zwei weitere Waschschrte mit je 15ml kaltem PBS^{-/-}. Im Anschluss wurden die Zellen in 10ml PBMC-Medium, das vorher 1:1 mit RPMI-1640 verdünnt wurde, resuspendiert. Danach wurde die Zellzahl bestimmt, eine Zellkonzentration von 5×10^5 Zellen/ml eingestellt und die Zellen für 1,5h vor dem Adhäsionstest im Brutschrank inkubiert.

3.4.1.2 PKH67 Färbung

PKH67 ist ein grün fluoreszierender Farbstoff (Anregung/Emission: 490/502nm), der aufgrund seiner langen aliphatischen Reste in die Zellmembran inkorporiert werden kann. Da die Färbeprozedur unter physiologischen Bedingungen durchgeführt wird, können mit dem Farbstoff lebende Zellen markiert werden. Die Färbung wurde mit dem *PKH67 Fluorescent Cell Linker Kit* (Sigma GmbH) durchgeführt und erfolgte nach folgendem Protokoll: Zunächst wurden 2×10^7 Zellen in ein 50ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 200g für 10Min. abzentrifugiert. Im Anschluss wurden die Zellen 1x mit PBS^{-/-} gewaschen und anschließend zentrifugiert (200g, 10Min.). Danach wurden die Zellen in 1ml Diluent C resuspendiert. Es wurde eine 2x Färbelösung (4 μ M) aus 1ml Diluent C und 4 μ l PKH67 Stammlösung hergestellt und zur Zellsuspension hinzugefügt. Es folgte eine Inkubation für 5Min. im Dunkeln bei RT. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2ml FCS für 1Min. abgestoppt. Danach erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (200g, 10Min.) sowie zwei Waschrte mit PBMC-Medium. Nach der 1. Zentrifugation wurde das Zentrifugenröhrchen gewechselt. Zum Schluss wurde die Zellzahl bestimmt, eine Zellkonzentration von 10^6 Zellen/ml eingestellt und die Zellen für 1,5 Stunden vor dem Adhäsionstest im Brutschrank inkubiert.

3.4.2 Statisches Testsystem

3.4.2.1 Adhäsionstest

Die Durchführung des statischen Adhäsionstests erfolgte nach folgendem Protokoll: Zunächst wurden die Endothelzellen in Zellkulturgefäße eingesät (Petrischalen oder T12,5) mit einer Einsaatdichte von 10^4 Zellen/cm². Die Zellen wurden 2-4 Tage vor der Bestrahlung kultiviert, bis ein konfluent Monolayer gebildet wurde. Die hier verwendeten primären Endothelzellen waren nicht in der Lage einen konfluenten Monolayer auszubilden. Hier wurden die Experimente ab einer Konfluenz von ca. 80% durchgeführt. Zum Beginn des Experiments erfolgte eine Bestrahlung der Endothelzellen. Direkt nach der Bestrahlung erfolgte ein Mediumwechsel. Zur Steigerung der Adhäsion wurden die Endothelzellen direkt nach der Bestrahlung mit TNF- α (1-10ng/ml) stimuliert [24]. Als Negativ-/ bzw. Positivkontrollen wurden in jedem Experiment unbestrahlte und unstimulierte bzw. nur mit TNF- α stimulierte Proben mitgeführt. Die Proben wurden nach Bestrahlung für 24 Stunden im Brutschrank

inkubiert. Nach der Inkubation wurden je Probe insgesamt 10^6 markierte PBL zu den Endothelzellen gegeben und dann für 30Min. im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurde der Überstand wieder abgenommen. Um die verbliebenen nicht-adhärenenten PBL zu entfernen, wurden die Proben noch 2x mit warmem PBS^{-/-} gewaschen. Für eine mikroskopische Auswertung wurden die Proben im Anschluss mit eiskaltem Methanol für 15Min. fixiert und dann über Nacht, im Dunkeln an der Luft getrocknet. Für die Auswertung am Durchflusszytometer wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst (siehe Kapitel 3.1.4.3), vereinzelt und dann direkt gemessen.

3.4.2.2 Mikroskopische Quantifizierung

Für die mikroskopische Quantifizierung wurden die Biotin markierten PBL nach folgendem Protokoll angefärbt: Zunächst wurden die Zellen mit je 1ml Tris-Puffer (50mM, pH 6,7) für 1Min. rehydriert und anschließend mit 1ml Tris-BSA-Puffer (1% BSA, 0,01% Tween20) für 10Min. permeabilisiert. Danach erfolgte die Färbung mit dem Streptavidinkonjugat (Cy3, oder FITC) für 45Min. bei RT (Konzentration der Färbelösung: $3\mu\text{g}/\text{ml}$). Im Anschluss wurden die Zellen 2x mit je 2ml Tris-Puffer gewaschen, dann mit Vectashield-Mounting Medium (Vector Laboratories) überschichtet und mit einem Deckglas abgedeckt. Die Quantifizierung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (DMIRE 2, Leica). Zunächst wurde mittels Phasenkontrastmikroskopie der Monolayer auf seine Gleichmäßigkeit überprüft. Dann wurden je Probe 10 zufällig ausgewählte Gesichtsfelder fotografiert (Abb. 11). Für den Cy3 Farbstoff wurden folgende Absorptions-/Emissions-Wellenlängen verwendet: 552/580nm, für FITC 490/510nm. Die Belichtungszeit betrug je nach Färbungsstärke zwischen 50-200ms. Für die Auswertung wurde die Summe der adhärenenten PBL pro Probe ermittelt.

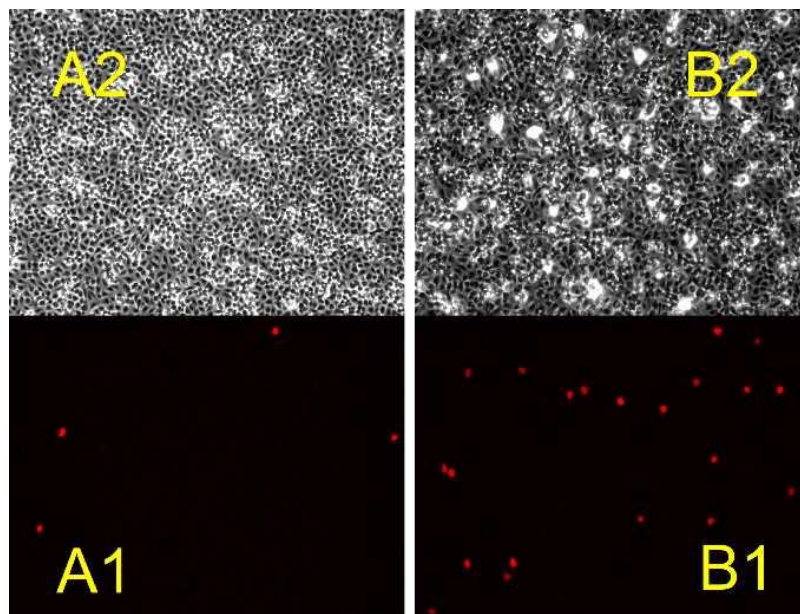


Abb. 11: Mikroskopische Auswertung des Adhäsionstests: Adhäsion von Biotin markierten PBL (A1, B1), an den Endothelzell-Monolayer (A2, B2). Vergleich zwischen unstimulierten- (A) und TNF- α (10ng/ml) stimulierten- (B) Endothelzellen. (Vergrößerung: 100x)

3.4.2.3 Durchflusszytometrische Quantifizierung⁷

Um für die Auswertung des Adhäsionstests eine breitere statistische Basis zu erreichen und um subjektive Faktoren beim Auszählen der adhärenzten PBL zu vermeiden, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Methode zur durchflusszytometrischen Quantifizierung der PBL-Adhäsion etabliert. Für diese Methode wurden die PBL und Endothelzellen während der Co-Inkubation zusätzlich mit dem DNA-Farbstoff Hoechst 33342 (1µM, Sigma) gefärbt. Hoechst 33342 ist ein membrangängiger DNA-Farbstoff (Anregung/Emission: 355/465nm) der in AT-reiche Regionen doppelsträngiger DNA interkaliert und für Lebend-Zell-Färbungen verwendet werden kann. Nach der Co-Inkubation und dem Ablösen der Zellen erfolgte eine Zentrifugation (200g, 10Min.). Im Anschluss wurden die Zellen in PBS^{-/-} resuspendiert.

Im Durchflusszytometer erfolgte eine Detektion des Fluoreszenzsignals von Hoechst 33342 (FL6) und von PKH67 (FL1). Zur Auswertung wurden die Messdaten in verschiedenen Histogrammen dargestellt (Abb. 12 Histogramm 1-6). In Histogramm 1 wurde das FSC- gegen das SSC-Signal aufgetragen. Durch das Setzen von Gate R1 wurde die Population der Endothelzellen und der PBL von vorhandenen Zellfragmenten bzw. -Aggregaten abgetrennt. Im Histogramm 2 ist das FL6-Signal gegen die Anzahl aufgetragen. Durch Setzen von Gate RN1 wurden nur Zellen mit einem intakten Zellkern in die weitere Auswertung eingeschlossen. Hierfür wurde das logische Gate G1 erstellt, welches R1 und RN1 mit einer UND-Verknüpfung verbindet. Alle anderen Histogramme wurden auf G1 *gegatet*. In Histogramm 3 ist das Fluoreszenzsignal von FL1 aufgetragen. In Histogramm 5 ist FL6 gegen FL1 aufgetragen. Durch das Setzen der Quadranten QA1-4 wurde die Population der PBL (QA2) von den Endothelzellen (QA4) abgetrennt. Für die Auswertung wurden insgesamt 10.000 Zellen verwendet. Die Anzahl der adhärenzten PBL ergab sich aus Quadrant QA2. Da in einigen Fällen die Färbung mit Hoechst 33342 nur unvollständig abgelaufen war, konnte der DNA-Gehalt dieser Zellen nicht für die Auswertung herangezogen werden. In diesen Fällen wurde die Auswertung in Histogramm 4 verwendet. Hier wurde SSC gegen FL1 aufgetragen, um eine Unterscheidung von PBL und Endothelzellen zu ermöglichen.

⁷ Für Grundlagen der Durchflusszytometrie siehe Kapitel 3.3.1

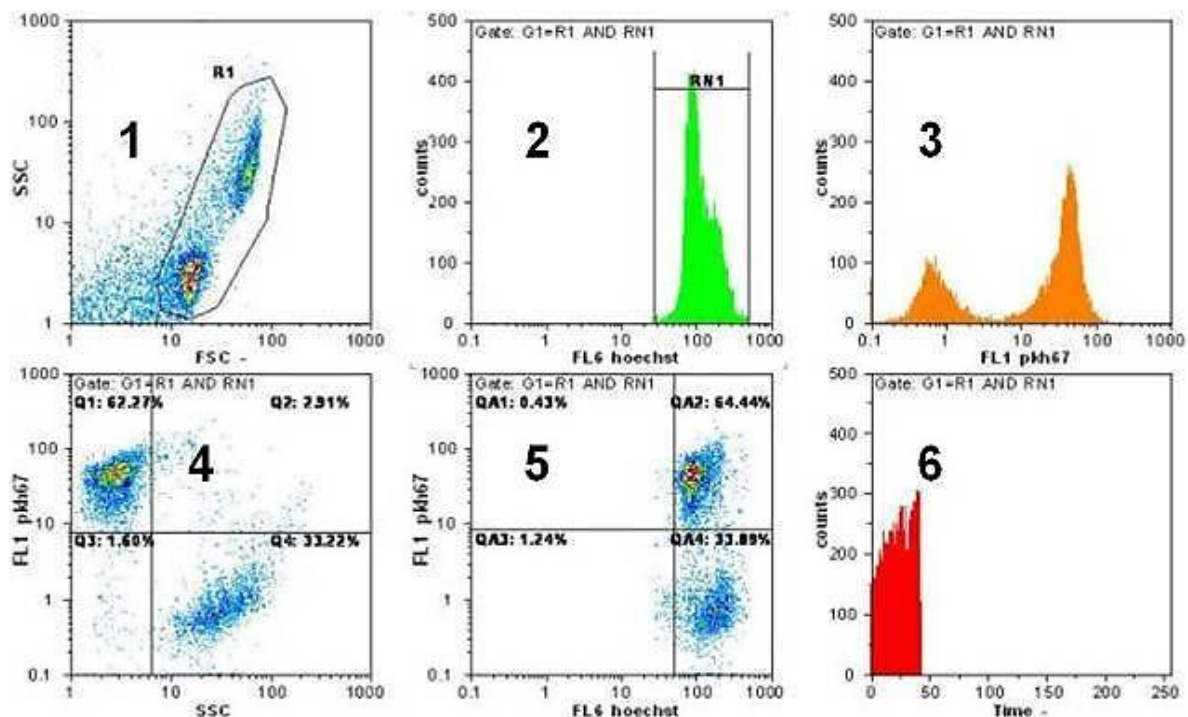


Abb. 12: Auswertung der Daten der durchflusszytometrischen Quantifizierung der Endothelzellen und PBL im Adhäsionstest. Histogramme: FSC gegen SSC (**1**); FL6=Hoechst 33342 (**2**); FL1=PKH67 (**3**); SSC gegen FL1 (**4**), FL6 gegen FL1 (**5**), gezählte Zellen pro Sekunde (**6**); Gate R1: Endothelzell- und PBL-Population; Gate RN1: DNA-Gehalt; Gate G1: logisches Gate (R1 UND RN1); Q1-4 bzw. QA1-4: Dotplot SSC/FL1 bzw. FL6/FL1 zur Quantifizierung der PBL.

3.4.2.4 TGF- β Neutralisierungsversuche

In einigen Publikationen (bspw. Rödel et al. und Arenas et al.) wurde eine mögliche Rolle von TGF- β bezüglich der Vermittlung der strahleninduzierten Adhäsionsreduktion diskutiert [24, 49]. In der Arbeit von Rödel et al. wurde diesbezüglich die Auswirkung einer Inhibition von TGF- β auf die Adhäsion untersucht. Hierzu wurden die Endothelzellen nach der Bestrahlung für die Dauer der 24 Stunden Inkubation zusätzlich mit einem anti-TGF- β Neutralisierungsantikörper behandelt. Durch diese Behandlung konnte die strahlungsvermittelte Adhäsionsreduktion komplett aufgehoben werden. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit zum einen der direkte Einfluss auf die Adhäsion von PBL, durch die Stimulierung der Endothelzellen mit TGF- β und zum anderen die Auswirkung einer Inhibition von TGF- β untersucht.

Zur Untersuchung der Auswirkung einer Inhibition von TGF- β wurde analog zur Publikation von Rödel et al. ein anti-TGF- β -Neutralisierungsantikörper (Invivogen) verwendet [24]. Für die Versuche wurden die Endothelzellen nach der Bestrahlung für 24 Stunden +/-TNF- α (1ng/ml) sowie zusätzlich +/- Neutralisierungsantikörper (5 μ g/ml) kultiviert. Zur Kontrolle einer möglichen unspezifischen Wirkung des Neutralisierungsantikörpers wurde ein Isotypantikörper in derselben Konzentration eingesetzt. Zusätzlich wurde die Wirkung des Neutralisierungsantikörpers auf die intrazelluläre TGF- β Signalwei-

terleitung untersucht.⁸ Ab einer Konzentration von 3 µg/ml konnte in diesen Versuchen eine maximale Inhibierung der TGF-β abhängigen Signalweiterleitung beobachtet werden, wobei keine vollständige Inhibierung der Signalweiterleitung erfolgte.

3.4.3 Dynamisches Testsystem

Endothelzellen befinden sich im Blutstrom in einer laminaren Strömung und sind somit einem permanenten Scherstress ausgesetzt. Da das statische System die physiologischen Bedingungen im Blutstrom nicht simulieren konnte, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein dynamisches Testsystem etabliert⁹, wodurch es möglich war diese Bedingungen besser nachzubilden.

3.4.3.1 Die Flow Chamber

Laminare Bedingungen können *in vitro* in einem speziellen Kulturgefäß (*Flow Chamber*) simuliert werden [51]. Es handelt sich dabei um einen speziellen Aufsatz, der in eine Petrischale (Ø 3.5cm) eingesetzt wird. Durch den Aufsatz kann dann Medium, mittels einer Schlauchpumpe, durch das System gepumpt werden. Dadurch wird in der Petrischale ein laminarer Strom erzeugt, der die physiologischen Bedingungen im Organismus simulieren kann.

Die Flow Chamber war folgendermaßen aufgebaut: Zunächst wurden auf den Boden der Petrischale zwei unterschiedliche Silikonplatten gelegt, jeweils mit einer Stärke von 0,1 cm (siehe Abb. 13). Die erste Silikonplatte (B) sollte die Entstehung von Turbulenzen durch den Zulauf des Mediums verhindern. Die zweite Silikonplatte (A) wurde als zusätzlicher Abstandshalter auf der ersten positioniert.

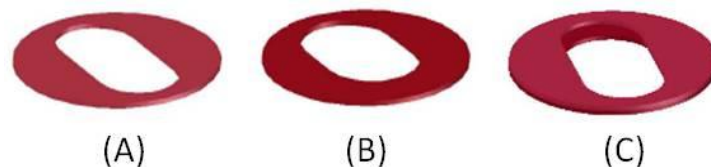


Abb. 13: Zwei Silikonplatten (C) mit unterschiedlichen Maßen wurden in einer Petrischale übereinander gelegt. Platte (A) liegt auf Platte (B) auf. Im Zentrum beider Platten befand sich die Wachstumsfläche für die Zellen [50].

Auf die beiden Silikonplatten wurde dann ein Aufsatz aus Plexiglas (Ø 3,45 cm, Höhe 1,8 cm) gesteckt (siehe Abb. 14). In den Randbereich des Aufsatzes waren zwei Edelstahlstifte (Ø 0,1 cm) für den Anschluss der Zu- und Abflussschläuche angebracht, die im Innern des Aufsatzes in eingelassene Kanäle (Ø 0,1 cm) mündeten. Der Aufsatz wurde so in die Petrischale eingesetzt, dass der Zulaufkanal direkt auf die erste Silikon Platte mündete, um das Turbulenzrisiko zu minimieren. Ein an den Aufsatz befestigter O-Ring dichtete das komplette System ab (siehe Abb. 15).

⁸ Im Rahmen einer Praktikumsarbeit

⁹ Etablierung teilweise im Rahmen einer Bachelorarbeit [50]

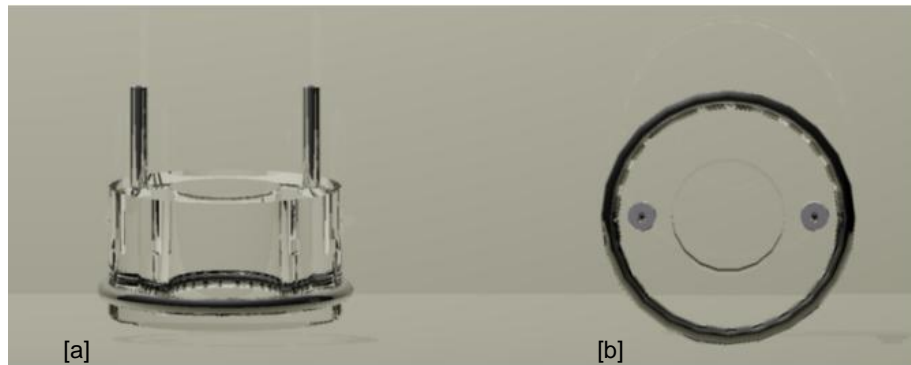


Abb. 14: Aufsatz für die Petrischale: An den Aufsatz, der aus Plexiglas bestand, waren zwei Edelstahlstifte befestigt, in die das Medium hinein- und herausgepumpt wurde [a]. Die Edelstahlstifte mündeten im Innern des Aufsatzes in Kanäle mit kleineren Durchmessern [b] [50].

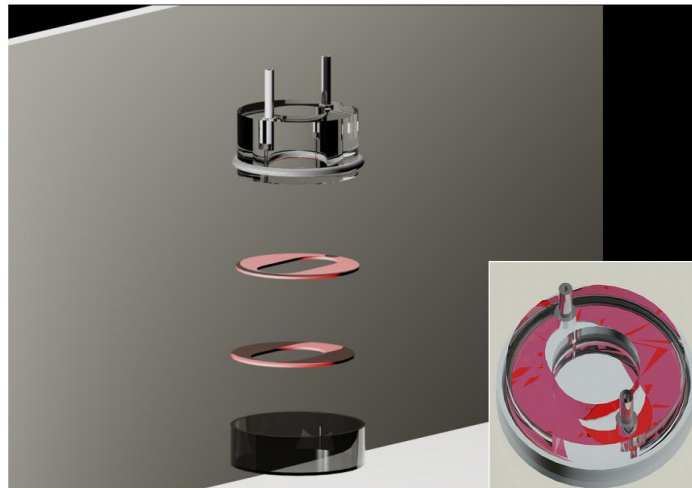


Abb. 15: Vollständige Kammer: Der Aufsatz wurde so in die Petrischale positioniert, dass der Kanal des Mediumszulaufes auf die erste Silikonplatte mündete. Ein an den Aufsatz befestigten O-Ring dichtete das komplette System ab [50].

Das Zellkulturmedium wurde durch Silikonschläuche (\varnothing 0,2 cm) durch die insgesamt acht Kammern gepumpt. Das Kreislaufsystem befand sich, bis auf die Schlauchpumpe, innerhalb eines Brutschanks. Den Anfang bildete eine T75 Zellkulturflasche der Firma *Falcon*, an der zum Anschluss der Silikonschläuche vier Edelstahlstutzen (\varnothing 0,15 cm) befestigt waren (siehe Abb. 16). An einen Stutzen waren jeweils zwei Kammern angeschlossen. Die T75 Flasche diente als Begasungskammer, in der sich das für die Kultivierung verwendete Medium befand. So konnte sich der korrekte pH-Wert durch den Gasaustausch von CO₂ im Medium einstellen. Außerdem wurde somit eine optimale Temperierung des Mediums auf 37°C gewährleistet.

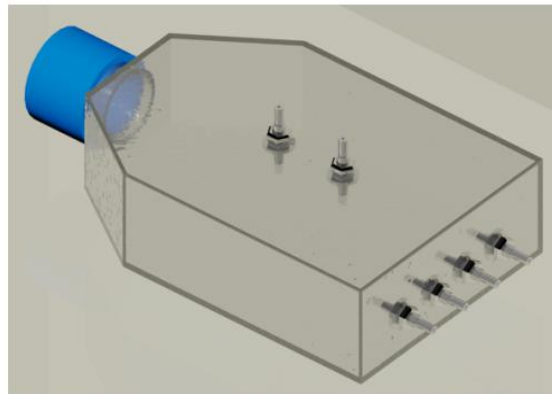


Abb. 16: Begasungskammer mit Anschlüssen für Zu- und Ablauf: In einer T75 Flasche befand sich das Medium für die Endothelzellen. Hier stellte sich die richtige Temperatur und pH für das Medium ein. An die Begasungskammer waren vier Edelstahlstutzen befestigt, zum Anschluss der Schläuche. An jeden der vier Stutzen waren jeweils zwei Kammern angeschlossen [50].

Die von der Begasungskammer ausgehenden Schläuche mündeten jeweils in einen der Edelstahlstifte der acht Kammern. An die übrigen Edelstahlstifte wurden ebenfalls Schläuche angeschlossen, um damit das Medium aus den Kammern zu pumpen. Die Schläuche führten von den Kammern aus dem Brutschrank heraus direkt in die Schlauchpumpe. Dabei hatte jede Kammer einen separaten Eingang in die Pumpe. Nach Durchtritt des Mediums durch die Pumpe führten die Schläuche der acht Kammern zurück in die im Brutschrank befindliche Begasungskammer (siehe Abb. 17).

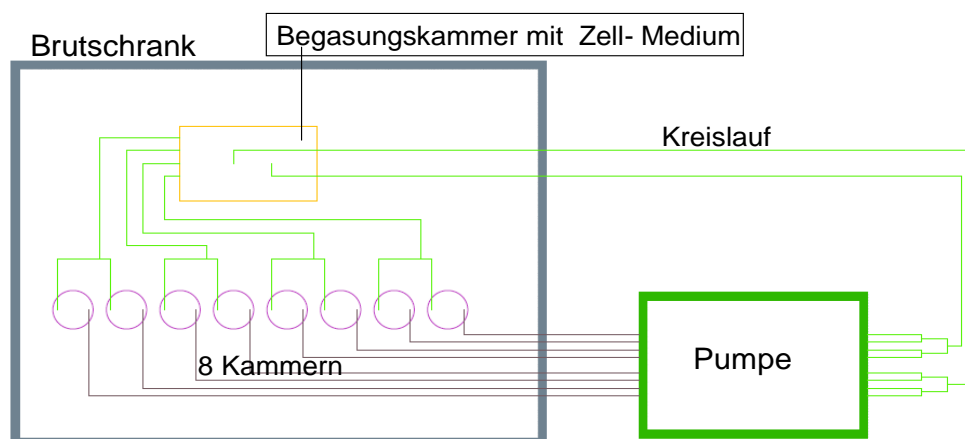


Abb. 17: Schematischer Aufbau des vollständigen Systems: Die Begasungskammer und die acht Kammern, die durch Silikonschläuche verbunden waren, befanden sich innerhalb des Brutschranks. Das Medium aus der Begasungskammer wurde über das Schlauchsystem zu jeder einzelnen Kammer befördert. Zum Herauspumpen des Mediums wurde jede Kammer über Silikonschläuche mit einem Anschluss an die Pumpe verbunden, die sich außerhalb des Brutschranks befand. Nach Durchlauf der Pumpe wurde das Medium wieder in den Brutschrank zurück in die Begasungskammer transportiert [50].

3.4.3.2 Kultivierung und Bestrahlung im laminaren Durchfluss

Vor der Kultivierung von Endothelzellen in der *Flow Chamber* wurden diese in Petrischalen ausgesät und für 18 Stunden im Brutschrank unter Standardbedingungen kultiviert. Innerhalb der Wachstumsfläche wurden jeweils 5×10^3 oder 1×10^5 Zellen/cm² für die Bestrahlungsexperimente je nach verwendeter Fließgeschwindigkeit eingesät. Damit die Zellen im mittleren Bereich der Petrischale und somit innerhalb des durch die Silikonplatten begrenzten Wachstumsbereichs adhärent wachsen konnten, wurden die Petrischalen vor Einsaat mit speziellen Silikonschablonen bestückt, die kurz vor dem Start der dynamischen Kultivierung wieder entnommen wurden.

Für die eigentliche dynamische Kultivierung wurde zunächst die Verschlauchung des kompletten Systems zusammengebaut und mit 70% Ethanol durchgespült. Zur Entfernung von Ethanol-Rückständen wurde anschließend für jeweils 20Min. steriles, destilliertes Wasser und steriles PBS^{-/-} durch die Schläuche gepumpt. Anschließend wurde das System mit dem Zellkulturmedium durchgespült.

Daraufhin wurden die für die Kultivierung unter Scherstress notwendigen Silikonplatten (siehe Abb. 13) in den Petrischalen positioniert. Auf die Silikonplatten wurden anschließend die Plexiglasaufsätze für den Zu- und Ablauf des Mediums gesteckt, die durch Silikonschläuche mit der Pumpe und der Begasungskammer verbunden wurden. Im Anschluss wurde in die Begasungskammer 100ml vorgewärmtes Medium gegeben, das bereits auf den richtigen pH-Wert eingestellt war. Nach dem Einstellen der korrekten Drehzahl (10 oder 30 U/min) wurde die dynamische Kultivierung gestartet. Die Endothelzellen wurden zunächst für 2-3 Tage in der *Flow Chamber* kultiviert.

Für die Bestrahlung wurden die Petrischalen aus dem Systems herausgenommen und danach wieder eingesetzt. Nach der Bestrahlung wurden zwei weitere Begasungskammern in das System integriert, um zum einen die unstimulierten Proben von den TNF- α stimulierten und zum anderen um die bestrahlten- von den unbestrahlten Proben zu trennen. In den Versuchen wurde die gleiche TNF- α Konzentration wie im statischen Testsystem verwendet. Auch die Kultivierungsdauer betrug ebenfalls 24 Stunden.

Alle drei Wochen wurden sämtliche Schläuche, Silikonschablonen und -platten sowie die Aufsätze autoklaviert.

3.4.3.3 Adhäsionstest unter dynamischen Bedingungen

Zur Behandlung der in der *Flow Chamber* kultivierten, bestrahlten und stimulierten Endothelzellen wurde das System wieder in das Ausgangssystem mit nur einer Begasungskammer umgebaut. Diese wurde mit 40ml Zellsuspension der gefärbten PBL¹⁰ gefüllt. Die Zellsuspension hatte eine Konzentration von ca. 10^6 Zellen/ml und wurde für 30Min. durch alle acht Kammern gepumpt.

Im Anschluss wurden die Petrischalen mit den Endothelzellen aus dem System entfernt und 2x mit warmen PBS^{-/-} gewaschen. Zur Fixierung der Zellen wurden die Petrischalen mit jeweils 1ml einer 3% PFA-Lösung versehen und für 15Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Inkubation wurde das PFA entfernt, die Zellen mit PBS^{-/-} und Reinstwasser gewaschen und für 24 Stunden luftgetrocknet. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop¹¹.

3.4.4 Statistische Auswertung der Daten

Innerhalb eines Experimentes wurden die Daten von gleichbehandelten Proben zu Mittelwerten zusammengefasst und die Standardabweichung berechnet. Da die Anzahl der adhärennten PBL spenderbedingt zwischen den Experimenten stark variierte, wurden die Mittelwerte aller Proben innerhalb eines Experiments auf den Mittelwert der Positivkontrollen (unbestrahlt, TNF- α stimuliert) bezogen. Die relativen Mittelwerte der einzelnen Experimente wurden dann zusammengeführt und der Standardfehler berechnet. Zur Bestimmung der statistischen Signifikanz wurde der *unpaired* T-Test durchgeführt.

3.5 Bestimmung der Zytokin-Freisetzung

3.5.1 Enzym-linked-immunosorbent-assay (ELISA)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Veränderung der Zytokin-Freisetzung von humanen Zellen (Endothelzellen, Makrophagen und PBL) durch ionisierende Strahlung untersucht. Hierzu wurde die Konzentration der Zytokine mittels ELISA im Überstand der Zellen bestimmt. Das Funktionsprinzip des ELISA Systems beruht auf der spezifischen Wechselwirkung zwischen Antikörper und dem entsprechenden Antigen [46]. In dieser Arbeit wurde ausschließlich die sogenannte "*Sandwich-ELISA*" Methode verwendet. Bei dieser Methode wird zunächst ein sog. *Capture*-Antikörper auf einer Plastikoberfläche immobilisiert. Der *Capture*-Antikörper bindet spezifisch das gelöste Antigen, das dann durch Auswaschen von den restlichen nicht-gebundenen Bestandteilen der Lösung abgetrennt werden kann. Zur Konzentrationsbestimmung wird dann ein sekundärer Antikörper zugegeben, der an ein anderes Epitop bindet als der *Capture*-Antikörper. An den sekundären Antikörpern ist ein

¹⁰ Siehe Kapitel 3.4.1.2

¹¹ Siehe Kapitel 3.4.2.2

Amplifikator gebunden, der eine Farbreaktion katalysiert. Die Konzentration des gebildeten Farbstoffs ist dabei proportional zur Konzentration des entsprechenden Antigens [46]. Durch Verwendung einer Standard-Verdünnungsreihe des Antigens mit genau definierten Konzentrationen lässt sich eine Standard-Kurve erstellen, mittels derer man die Konzentration in der zu untersuchenden Probe bestimmen kann. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Kits (R&D Systems Inc., eBioscience Inc.) wurde das Enzym Meerrettichperoxidase als Amplifikator verwendet. Das Enzym wurde über eine Biotinylierung¹² an den Sekundär-Antikörper gebunden. Als Chromophor wurde Tetramethylbenzidin (TMB) und als Substrat für die Peroxidase wurde Wasserstoffperoxid verwendet. Die durch die Katalyse entstehenden Protonen oxidieren das TMB zu einem blauen Farbstoff, der durch Abstoppen der Reaktion mit Schwefelsäure in einen stabilen gelben Farbkomplex umgewandelt wird.

3.5.2 Versuchsprotokoll Zytokinbestimmung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Freisetzung der folgenden Zytokine ermittelt: TGF- β , IL-10 als anti- und TNF- α , als pro-inflammatorisches Zytokin. Die Untersuchung der Zytokin-Freisetzung der in dieser Arbeit verwendeten Zellen sowie deren Veränderung durch Bestrahlung und/oder Co-Kultivierung erfolgte nach folgendem Protokoll: Adhärenente Zellen wurden mit einer Einsaatdichte von 10^4 Zellen/cm² eingesät.¹³ Suspensionskulturen wurden mit einer Zellkonzentration $5 \cdot 10^5$ Zellen/ml kultiviert.

3.5.2.1 Veränderung der Zytokin-Freisetzung durch Bestrahlung

Die Bestrahlung erfolgte bei adhärenenten Zellkulturen ab einer Konfluenz von ca. 90%. Nach der Bestrahlung wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und die Zellen dann für 20-24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Da im FCS größere Mengen TGF- β enthalten waren, wurde zu jedem Experiment eine Kontrollprobe des Mediums mit eingefroren, die den gleichen Kultivierungsbedingungen ausgesetzt war. Nach dem Ende der Inkubation wurde das Medium abgenommen und bei 10.000g für 5Min. abzentrifugiert, um noch vorhandene Zellreste abzutrennen. Im Anschluss wurde der Überstand aliquotiert und bei -80°C gelagert. Zusätzlich wurde von allen Proben die Zellzahl bestimmt.

3.5.2.2 Veränderung der Zytokin-Freisetzung durch Co-Inkubation

Die Auswirkung einer Co-Inkubation auf die Zytokin-Freisetzung wurde in dieser Arbeit mit Makrophagen und PBL untersucht. Hierfür wurden beide Zellen zunächst getrennt kultiviert¹⁴. Vor der Co-Inkubation wurden entweder die PBL oder die Makrophagen bestrahlt. Die beiden Zelltypen wurden

¹² Siehe Kapitel 3.4.1.1

¹³ ausgenommen Makrophagen, siehe Kapitel 3.1.5.2

¹⁴ Siehe Kapitel 3.1.5

entweder direkt nach der Bestrahlung zusammen gegeben oder zunächst für einen Zeitraum von 1,5-48 Stunden weiter separat kultiviert und erst dann zusammen gegeben. Die Co-Kultivierung erfolgte für 20 Stunden. Dieser Zeitpunkt wurde aufgrund von Literaturdaten gewählt, in denen nach 20 Stunden eine maximale Zytokin-Freisetzung beobachtet wurde [52]. Nach Ende der Co-Inkubation wurde ebenfalls der Überstand abgenommen, bei 10.000g für 5Min. abzentrifugiert, im Anschluss aliquotiert und bei -80°C gelagert. Zusätzlich wurde von allen Proben die Zellzahl bestimmt. Zum Vergleich wurden in den Experimenten die jeweiligen Mono-Kulturen als Kontrollen mitgeführt.

3.5.2.3 Durchführung des ELISA

Die Durchführung der ELISA erfolgte nach dem Protokoll des jeweiligen Herstellers in 96-well-Platten. Nach der Beschichtung der Platten wurde der Fangantikörper zunächst mit einem Blockierungsreagenz für 1 Stunde behandelt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten erfolgten jeweils mehrere Waschschrte. Danach wurde je 100µl Probe, bzw. Standard zugegeben und für 2 Stunden bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde der Sekundärantikörper zugegeben und für 1 Stunde inkubiert. Anschließend wurde die Meerrettichperoxidase an den Sekundärantikörper für 20-30Min. angekuppelt. Zum Schluss wurde dann die Substratlösung zugegeben und für 15-20Min. inkubiert. Die Reaktion wurde dann mit 2N Schwefelsäure abgestoppt. Die Messung der optischen Dichte erfolgte direkt im Anschluss an einem 96-well Spektrometer (EL 808, BioTek Instruments Inc.) bei einer Wellenlänge von 450nm. Zum Ausgleich der optischen Inhomogenität der 96-well-Platte wurde zusätzlich eine Messung mit 570nm durchgeführt und die Differenz der beiden Werte ($\Delta 450/570$) gebildet. Die Berechnung der Standardkurve, der $\Delta 450/570$ -Werte, sowie der Konzentration der Proben erfolgte durch die Software Gen5TM (BioTek Instruments Inc.). Zur Auswertung wurde zunächst die Gesamtmenge des ausgeschütteten Zytokins berechnet. Für Monokulturen wurde die Gesamtmenge des Zytokins auf die Zellzahl der jeweiligen Probe bezogen, da die Zellzahl durch die Bestrahlung oder Stimulierung verändert werden kann. Als Ergebnis wurde die Gesamtmenge des ausgeschütteten Zytokins pro 10⁵ Zellen angegeben. Die Werte von biologischen Duplikaten wurden zu Mittelwerten zusammengefasst und die Standardabweichung berechnet.

3.5.2.4 Stickoxid

Zusätzlich wurde noch das Radikal Stickoxid (NO) untersucht. Dieses Radikal wird im Körper vor allem von aktivierten Makrophagen aber auch von Endothelzellen und Neuronen gebildet. Das von den Makrophagen ausgeschüttete NO dient zur Bekämpfung von Krankheitserregern. Wohingegen das von Endothelzellen gebildete NO als Signalmolekül fungiert. Durch die Freisetzung von bereits geringen Mengen NO wird u.a. eine Relaxion der glatten Gefäßmuskulatur bewirkt, was zu einer Weitung der Gefäße führt und in direktem Zusammenhang mit dem Entzündungsprozess steht. Die Bestimmung der NO-Konzentration erfolgte hierbei kolorimetrisch mit einem modifizierten Griess-Reagenz.

3.6 Methoden zur Messung strahleninduzierter Apoptose

3.6.1 Annexin-V Färbung

Phosphatidylserin (PS) ist ein negativ geladenes Phospholipid, das auf der Innenseite der Plasmamembran von fast allen eukaryotischen Zellen lokalisiert ist [53]. Die Umverteilung von PS von der Innen- zur Außenseite der Plasmamembran ist ein Prozess der bereits sehr früh während der Apoptose auftritt [53, 54]. PS dient unter anderem als Signalmolekül für Makrophagen und ermöglicht die Phagozytose von apoptotischen Zellen [55]. Annexin-V ist 35kDa großes Membranprotein von Makrophagen. Es ist in der Lage Phospholipide zu binden und weist eine hohe Ca^{2+} -Ionen abhängige Affinität zu PS auf [56]. In der späten Phase der Apoptose sowie in nekrotischen Zellen kommt es zu einem Verlust der Membranintegrität, so dass auch die Innenseite der Plasmamembran für Annexin-V zugänglich wird [54]. Um früh- und spät-apoptotische Zellen bzw. nekrotische Zellen voneinander zu unterscheiden, wird der Farbstoff Propidiumiodid (PI) verwendet. PI färbt sowohl DNA als auch RNA Moleküle und kann nicht durch eine intakte Zellmembran diffundieren. Somit können durch PI nur spät-apoptotische sowie nekrotische Zellen angefärbt werden. In dieser Arbeit wurde das *Annexin-V-FLUOS Staining Kit* (Roche GmbH) sowie das *Annexin V-FITC Kit* (Miltenyi Biotec GmbH) verwendet. In beiden Kits war das Annexin-V an den Farbstoff Fluoreszein (FITC) gekoppelt. Die Bestrahlungsexperimente sowie die Färbungen, wurden zum einen mit Suspensionszellen (PBL) und zum anderen mit adhären Zellen (Endothelzellen und Makrophagen) durchgeführt.

3.6.1.1 Bestrahlung und Färbung von Suspensionskulturen

Für die Bestrahlung von Suspensionskulturen wurden die Zellen mit einer Konzentration von 1 bis 5×10^6 Zellen/ml bestrahlt. Es wurde je Dosis nur ein Zell-Pool bestrahlt, aus dem dann die Zellen auf die einzelnen Proben verteilt wurden. Direkt nach der Bestrahlung erfolgte ein Mediumwechsel. Die Zellen wurden dann für 24-72 Stunden im Brutschrank inkubiert. 1 Stunde vor Ende der Inkubation wurden die Zellen mit $1 \mu\text{M}$ Hoechst 33342 gefärbt. Nach der Inkubation wurden die Zellen abzentrifugiert (200g, 10Min.), mit 2ml PBS^{-} gewaschen und erneut abzentrifugiert. Im Anschluss wurden die Zellen für 10-15Min. in $100 \mu\text{l}$ Färbelösung (Annexin-V-FITC + PI) im Dunkeln bei RT inkubiert, gefolgt von einem weiteren Waschschrift. Anschließend wurden die Zellen in PBS^{-} + $1 \mu\text{M}$ Hoechst 33342 resuspendiert und dann direkt im Durchflusszytometer gemessen¹⁵. Zur Auswertung der Daten wurde zunächst in Histogramm 1 (Abb. 18) das FSC gegen das SSC Signal aufgetragen, um die PBL-Population mit Gate R1 abzugrenzen. Alle anderen Histogramme wurden dann auf R1 *gated*. In Histogramm 2 und 3 wurde jeweils das Signal von FL1 (Annexin-V-FITC) bzw. FL2 (PI) gegen die Anzahl aufgetragen. In Histogramm 4 wurde dann FL1 gegen FL2 aufgetragen, um die nicht-, früh- oder spät-

¹⁵ durchflusszytometrische Grundlagen siehe Kapitel 3.3.1

apoptotische Zellen unterscheiden zu können. Hierzu wurde das Histogramm in die Quadranten Q1-4 unterteilt. In Q3 befinden sich die nicht-apoptotischen Zellen (Annexin-V und PI negativ). In Q4 befinden sich die früh-apoptotischen (Annexin-V positiv) und in Q2 die spät-apoptotischen bzw. nekrotischen Zellen (Annexin-V und PI positiv). Um ein Überlappen der Fluoreszenzsignale zwischen dem FL1 und dem FL2 Kanal zu verhindern, wurde eine elektronische Kompensation der Geräteeinstellungen durchgeführt. Es wurden je Probe 10000 Zellen ausgewertet.

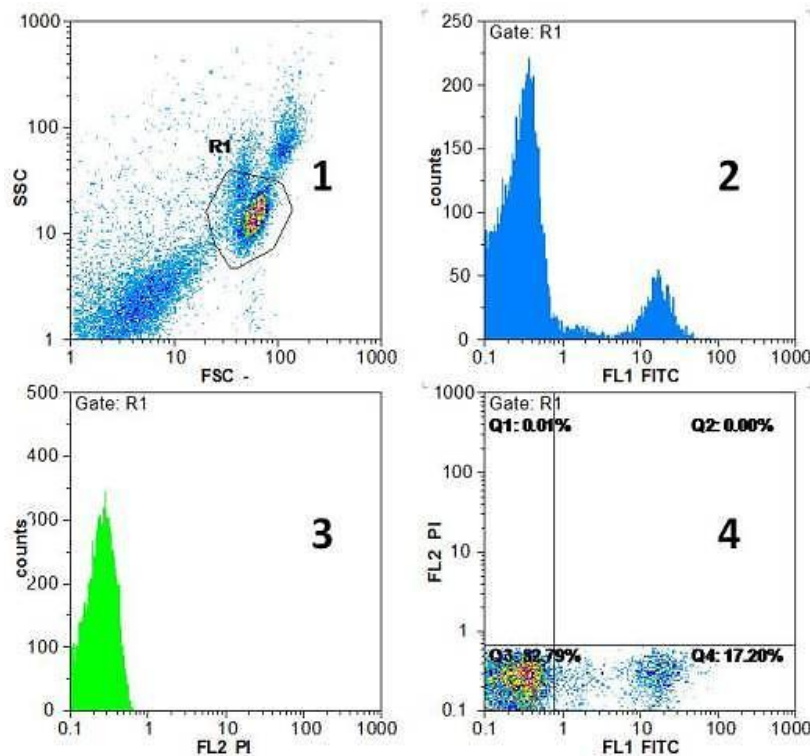


Abb. 18: Durchflusszytometrische Auswertung der Apoptoseinduktion in PBL durch Annexin-V-FITC/PI Färbung. Histogramme: FSC gegen SSC (1); FL1=Annexin-V-FITC (2); FL2=PI (3); FL1 gegen FL2 (4). Gate R1: PBL-Population; Gate Q1-4: Unterteilung der PBL-Population in nicht- (Q3), früh- (Q4) oder spät-apoptotische (Q2) Zellen.

3.6.1.2 Bestrahlung und Färbung von adhärenenten Zellkulturen

Für die Bestrahlung von adhärenenten Zellkulturen wurden die Zellen mit einer Einsaatdichte von 10^4 Zellen/cm² eingesät.¹⁶ Die Zellen wurden dann für 1-3 Tage weiter kultiviert und ab einer Konfluenz von ca. 90% bestrahlt. Direkt nach der Bestrahlung erfolgte ein Mediumwechsel, gefolgt von einer Kultivierung der Zellen für 24-72 Stunden. 1 Stunde vor Ende der Kultivierungsdauer wurden die Zellen mit 1µM Hoechst 33342 gefärbt. Ab diesem Punkt wurden unterschiedliche Protokolle für die Färbung von Monozyten/Makrophagen oder Endothelzellen verwendet. Monozyten/Makrophagen wurden nach der Inkubation zunächst mit 2ml PBS⁻ gewaschen und dann mit einem Zellschaber

¹⁶ Ausnahme Monozyten/Makrophagen, siehe Kapitel 3.1.5.2

abgelöst. Ab diesem Punkt erfolgte die Färbung und Detektion analog zur Färbung der PBL.¹⁷ Endothelzellen wurden hingegen nicht abgelöst, da ein Ablösen mit Trypsin bewirkt hätte, dass Aggregate aus mehreren Zellen zu falsch-positiven Signalen geführt hätten. Die adhärennten Zellen wurden nach dem Waschschrift für 15Min. mit 100µl Färbelösung (Annexin-V-FITC + PI) inkubiert und mit einem Deckglas abgedeckt. Nach der Inkubation wurden die Zellen 1x mit PBS^{-/-} gewaschen und dann für 1 Stunde mit 4% PFA bei RT fixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen zunächst 2x mit PBS^{-/-}, dann 1x mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend über Nacht im Dunkeln luftgetrocknet. Nach diesem Schritt wurden die Zellen im Dunkeln bei 4°C gelagert. Zum Mikroskopieren wurden die Zellen mit Vectashield-Mounting Medium (Vector Laboratories) überschichtet und mit einem Deckglas abgedeckt. Die Quantifizierung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (DMIRE 2, Leica). Zunächst wurde mittels Phasenkontrastmikroskopie der Monolayer auf seine Gleichmäßigkeit überprüft. Dann wurden je Probe 10 zufällig ausgewählte Gesichtsfelder fotografiert (Abb. 19). Für den PI Farbstoff wurden eine Absorptions-/Emissions-Wellenlängen von 552/580nm verwendet, für FITC: 490/510nm und für Hoechst 33342: 350/400. Die Belichtungszeit betrug je nach Färbungsstärke zwischen 600-1200ms. Für die Auswertung wurde die Summe der apoptotischen bzw. nekrotischen Zellen pro Probe ermittelt.

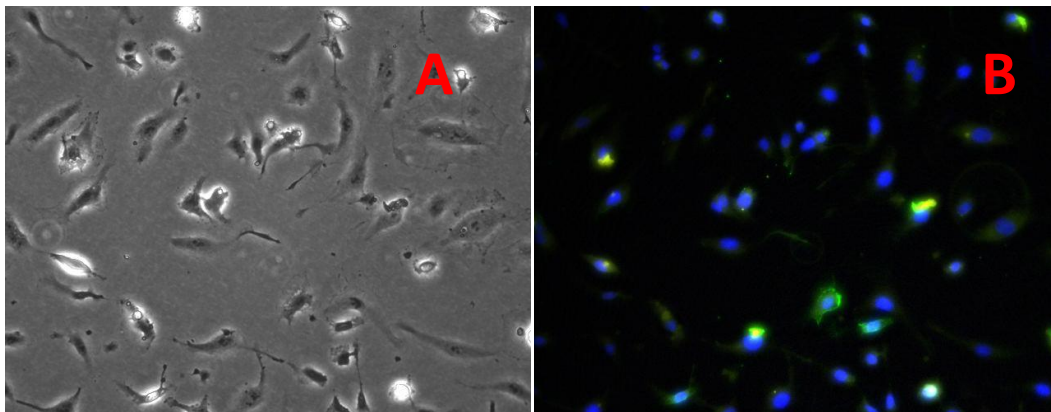


Abb. 19: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Annexin-V-FITC/PI gefärbten Zellen (HUVEC). **(A)** Phasenkontrast; **(B)** Zusammenführung der Kanäle (FITC, PI, Hoechst 33342). Bestrahlung mit 12Gy Röntgenstrahlung nach einer Inkubation von 24 Stunden. (**Vergrößerung: 200x**)

3.6.2 TUNEL-Test zur Bestimmung der DNA-Fragmentierung

Die Fragmentierung nuklearer DNA ist ein wichtiger Schritt in der Apoptose. Die Fragmentierung wird durch die Aktivierung von endogenen Nukleasen initiiert. Hierbei wird die DNA in ca. 200bp große Bruchstücke zerteilt. Durch den TUNEL-Test (*Terminal deoxynucleotidyl Transferase (TdT) - mediated dUTP Nick End Labeling*) ist es möglich diese Bruchstücke anzufärben. Hierzu werden das Enzym TdT sowie fluoreszenzmarkierte Nukleotide verwendet. Das Enzym katalysiert hierbei den Einbau der

¹⁷ siehe Kapitel 3.6.1.1

markierten Nukleotide an die 3'-hydroxyl-Enden der genomischen DNA. [57–59] In dem in dieser Arbeit verwendeten TUNEL-Test (*In Situ Cell Death Detection Kit, Fluoreszein*, Roche GmbH) wurden FITC markierte Nukleotide verwendet. Das Protokoll wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt und die apoptotischen Zellen im Durchflusszytometer¹⁸ gemessen. Die Bestrahlungsexperimente erfolgten analog zu Kapitel 3.6.1, mit Ausnahme des Färbeprotokolls.

Die durchflusszytometrische Auswertung der Daten ist in Abb. 20 dargestellt. Zur Auswertung der Daten wurde zunächst in Histogramm 1 das FSC gegen das SSC Signal aufgetragen, um die PBL-Population mit Gate R1 abzugrenzen. Im Histogramm 2 ist das FL6-Signal gegen die Anzahl aufgetragen. Durch Setzen von Gate RN1 wurden nur Zellen mit einem intakten Zellkern in die weitere Auswertung eingeschlossen. Hierfür wurde das logische Gate G1 erstellt, welches R1 und RN1 mit einer UND-Verknüpfung verbindet. Alle anderen Histogramme wurden auf G1 *gegatet*. In Histogramm 3 wurde das Signal von FL1 (FITC) gegen die Anzahl aufgetragen. In Histogramm 4 wurde dann FL6 gegen FL1 aufgetragen, um die nicht-apoptotischen von den apoptotischen Zellen unterscheiden zu können. Hierzu wurde das Histogramm in die Quadranten Q2+Q4 unterteilt. In Q4 befinden sich die nicht-apoptotischen (FITC negativ) und in Q2 die apoptotischen Zellen (FITC positiv). Je Probe wurden insgesamt 10000 Zellen ausgewertet.

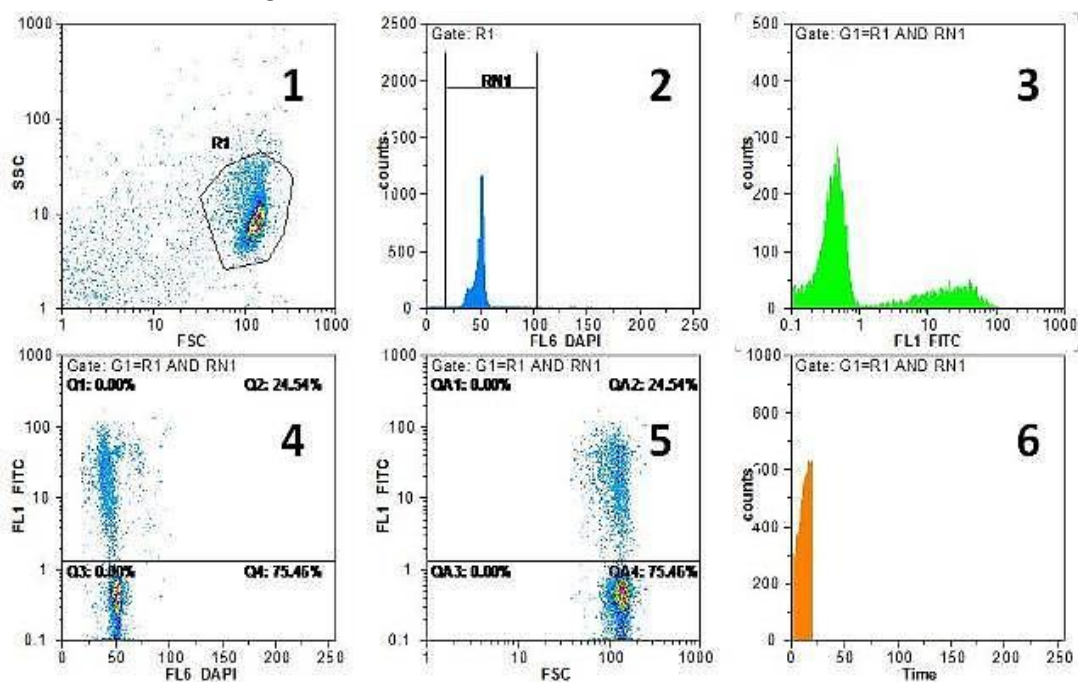


Abb. 20: Durchflusszytometrische Auswertung der Apoptoseinduktion in PBL mit TUNEL-Test. Histogramme: FSC gegen SSC (1); FL6=DAPI (2); FL1=FITC (3); FL6 gegen FL1 (4); FSC gegen FL1 (5); gezählte Zellen pro Sekunde (6); Gate R1: PBL-Population; Gate RN1: DNA-Gehalt; Gate G1: logisches Gate (R1 UND RN1); Gate Q2+4: Unterteilung der PBL-Population in nicht-apoptotische (Q4) und apoptotische (Q2) Zellen.

¹⁸ durchflusszytometrische Grundlagen siehe Kapitel 3.3.1

3.7 Messung der phagozytotischen Aktivität von Makrophagen

Zur quantitativen Bestimmung der phagozytischen Aktivität von Makrophagen wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Testsystem etabliert. Während der Etablierungsphase wurden verschiedene Makrophagen Subtypen¹⁹ verwendet.

3.7.1 Phagozytose Testsystem

Die Durchführung der Experimente zur Bestimmung der phagozytischen Aktivität erfolgte nach folgendem Protokoll: Zunächst wurden die Makrophagen für 7 Tage kultiviert, um die Differenzierung in die verschiedenen Subtypen zu ermöglichen. Die PBL desselben Spenders wurden über den gleichen Zeitraum in PBMC-Medium +10% autologes Serum kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage. Vor der Co-Inkubation der PBL und der Makrophagen wurden die PBL mit dem Membranfarbstoff PKH67 gefärbt.²⁰ Danach wurden die PBL mindestens für 1,5 Stunden in RPMI 1640 ohne FCS inkubiert. Anschließend wurde die Hälfte der Zellen mit einer Dosis von 6Gy bzw. 0,5 und 2Gy (Röntgenstrahlung/Kohlenstoffionen) bestrahlt. Direkt im Anschluss wurden die PBL in frischem X-Vivo15 ohne FCS resuspendiert und dann zwischen 2 und 20 Stunden mit den Makrophagen co-inkubiert. In den Experimenten erfolgte teilweise eine zusätzliche Stimulation der Zellen mit LPS (1-100ng/ml). Nach der Co-Inkubation wurde der Überstand abgenommen und die Makrophagen 2x mit je 2ml PBS^{-/-} gewaschen, um die nicht phagozytierten PBL zu entfernen. Im Anschluss wurden die Zellen für 30Min. in 1µM Hoechst 33342 inkubiert. Nach der DNA Färbung wurden die Zellen für 10Min. in Trypsin inkubiert, da diese Behandlung nur teilweise eine Ablösung der Makrophagen bewirkte, wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst, vereinzelt und in ein 1,9ml Reaktionsgefäß überführt. Es erfolgte eine Zentrifugation (200g, 10Min.). Anschließend wurden die Zellen in 1ml PBS^{-/-} +1µM Hoechst 33342 resuspendiert und direkt im Durchflusszytometer gemessen.²¹

Zur Auswertung der Daten wurde zunächst in Histogramm 1 (Abb. 21) das FSC gegen das SSC Signal aufgetragen, um die Makrophagenpopulation mit Gate R1 abzugrenzen. Im Histogramm 2 ist das FL6-Signal (DNA-Gehalt) gegen die Anzahl aufgetragen. Durch Setzen von Gate RN1 wurden nur Zellen mit einem intakten Zellkern in die weitere Auswertung eingeschlossen. Hierfür wurde das logische Gate G2 erstellt, welches R1 und RN1 mit einer UND-Verknüpfung verbindet. Alle anderen Histogramme wurden auf G2 *gegatet*. In Histogramm 3 ist das Fluoreszenzsignal von FL1 (PKH67) gegen die Anzahl der Zellen aufgetragen. Durch setzen des Gates RN2 konnte die mittlere Fluoreszenzintensität (MnX) der Makrophagenpopulation bestimmt werden. Als Kontrolle wurden die spontan ausdifferen-

¹⁹ Siehe Kapitel 3.1.5.2

²⁰ Siehe Kapitel 3.4.1.2

²¹ durchflusszytometrische Grundlagen siehe Kapitel 3.3.1

zierten Makrophagen (ohne M-CSF- bzw. GM-CSF-Stimulation) verwendet, die zusammen mit unbestrahlten PBL Co-inkubiert wurden.

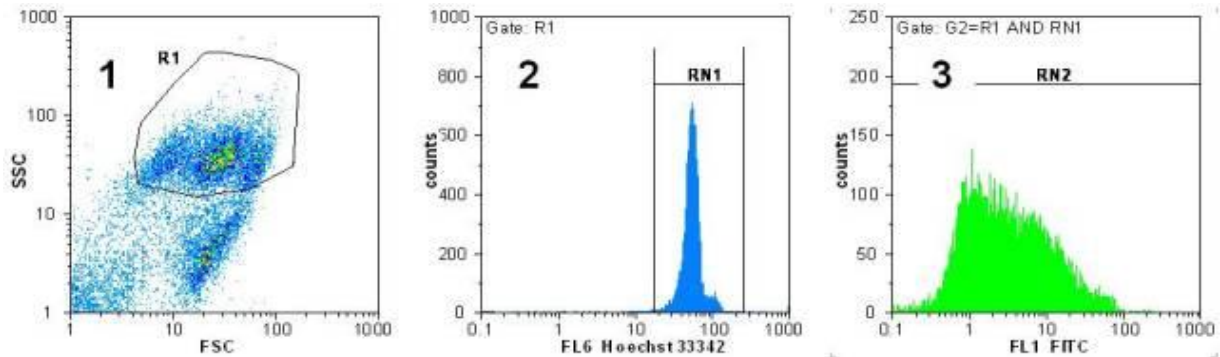


Abb. 21: Durchflusszytometrische Auswertung der phagozytischen Aktivität von Makrophagen. Gate R1: Makrophagenpopulation (1); Gate RN1: DNA-Gehalt (2); Gate G2: logisches Gate (R1 UND RN1); Gate RN2: PKH67 (FL1) Fluoreszenzsignal der Makrophagen (3).

3.7.2 Statistische Auswertung

Zur Auswertung wurden pro Probe jeweils 10000 Zellen einbezogen. Innerhalb eines Experiments wurden die MnX-Werte der gleich behandelten Proben zu Mittelwerten zusammengefasst und die Standardabweichung bestimmt. Um eine Vergleichbarkeit der verschiedenen Experimente zu gewährleisten, wurden innerhalb eines Experiments alle Werte auf die mittlere Fluoreszenzintensität der Positivkontrolle bezogen (relative phagozytische Aktivität). Die Ergebnisse der einzelnen Experimente wurden zu Mittelwerten zusammengeführt und der Standardfehler berechnet.

4 Ergebnisse

Im folgenden Kapitel werden die Rahmen dieser Arbeit gewonnen Ergebnisse präsentiert. Es wurden hierbei vier verschiedene Fragestellungen untersucht:

1. Induktion von Apoptose im Niedrigdosis-Bereich
2. Veränderung der Adhäsion von PBL an Endothelzellen durch Bestrahlung
3. Immunmodulierende Wirkung von apoptotischen PBL auf Makrophagen

Die Daten der hier präsentierten Abbildungen können den entsprechenden Wertetabellen im Anhang entnommen werden.

4.1 Induktion von Apoptose durch ionisierende Strahlung

Die Apoptose ist eine bereits sehr früh auftretende, unmittelbare Reaktion von Zellen auf Bestrahlung. Basierend auf bereits publizierten, experimentellen Daten wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit der Prozess der Apoptose als möglicher Ausgangspunkt für die anti-entzündliche Wirkung von Niedrigdosis Therapien ausgewählt [37]. Es wurden verschiedene Zelltypen (Blut-Lymphozyten (PBL), Makrophagen und Endothelzellen) dahingehend untersucht, ob in durch die Bestrahlung mit Photonen oder beschleunigten Ionen eine Induktion der Apoptose ausgelöst wurde. Beschleunigte Ionen wurden in dieser Arbeit verwendet, um die durch Radon emittierte α -Strahlung zu simulieren. Es wurde daher darauf geachtet, dass die verwendeten Ionen ein vergleichbares Energieniveau wie α -Teilchen aufwiesen.

4.1.1 Induktion von Apoptose in Blut-Lymphozyten

Die Induktion von Apoptose in PBL wurde bereits in mehreren Arbeiten beschrieben, sowohl nach Bestrahlung mit Photonen als auch nach Bestrahlung mit beschleunigten Ionen (Stickstoff, LET=140keV/ μ m) [60, 61]. PBL sind besonders strahlungssensitive Zellen. Aus diesem Grund wurden sie als mögliche, primäre *Target*-Zellen von Niedrigdosis-Bestrahlung (0,1-1 Gy) ausgewählt.

Die Bestrahlung wurde mit Röntgenstrahlung sowie mit beschleunigten Kohlenstoff- und Stickstoffionen durchgeführt. Hierbei wurden die PBL zum einen mit einer niedrigen Dosis (0,5Gy) sowie mit höheren Dosen (2, 6, 12Gy) bestrahlt. Die hohen Dosen wurden zum Vergleich mit den bereits publizierten Daten verwendet. Nach der Bestrahlung wurden die PBL für 24-72 Stunden unter Standardbedingungen inkubiert. Die Messung der Apoptose erfolgte mit der Annexin-V- oder TUNEL-Färbungsmethode. Die Ergebnisse der Bestrahlungsexperimente mit Röntgenstrahlung sowie Kohlenstoff- und Stickstoffionen sind in Abb. 22 dargestellt. In den Abbildungen ist der Prozentsatz der apoptotischen Zellen innerhalb der Gesamtpopulation (apoptotischer Index) in Abhängigkeit von der Dosis dargestellt. In den unbestrahlten Kontrollen war nach 24 Stunden eine grundlegende Apoptose

von ca. 5% zu verzeichnen. Bereits nach 24 Stunden war eine deutliche, dosisabhängige Zunahme der Apoptose für alle verwendeten Strahlungsarten zu beobachten (Abb. 22A). Eine Bestrahlung mit 0,5Gy Röntgenstrahlung reichte hierbei aus, um eine Steigerung der Apoptose nach 24 Stunden auf ungefähr 15% zu bewirken. Für höhere Dosen (≥ 6 Gy) lag der apoptotische Index nach 24 Stunden bereits bei 35%. Es konnte dabei kein Unterschied in der strahleninduzierten Apoptose im Vergleich von Photonen und Kohlenstoff- bzw. Stickstoffionen festgestellt werden. Nach 72 Stunden lag der apoptotische Index der Kontrollen bei 10%, nach Bestrahlung mit 0,5Gy Röntgenstrahlung bei 40% und nach Bestrahlung mit ≥ 6 Gy sogar bei 90% (Abb. 22B). Ab einer Dosis von 6Gy fand dabei keine weitere dosisabhängige Steigerung der Apoptose statt. Nach 72 Stunden war für Dosen ab 1,5Gy eine stärkere Induktion der Apoptose für Kohlenstoff- und Stickstoffionen zu beobachten.

Die Ergebnisse zeigen deutlich, das PBL sehr sensitiv auf ionisierende Strahlung reagieren. Erstaunlicherweise zeigt die Bestrahlung mit beschleunigten Ionen erst nach 72 Stunden eine stärkere Wirkung auf die Induktion von Apoptose im Vergleich zur Photonenstrahlung.

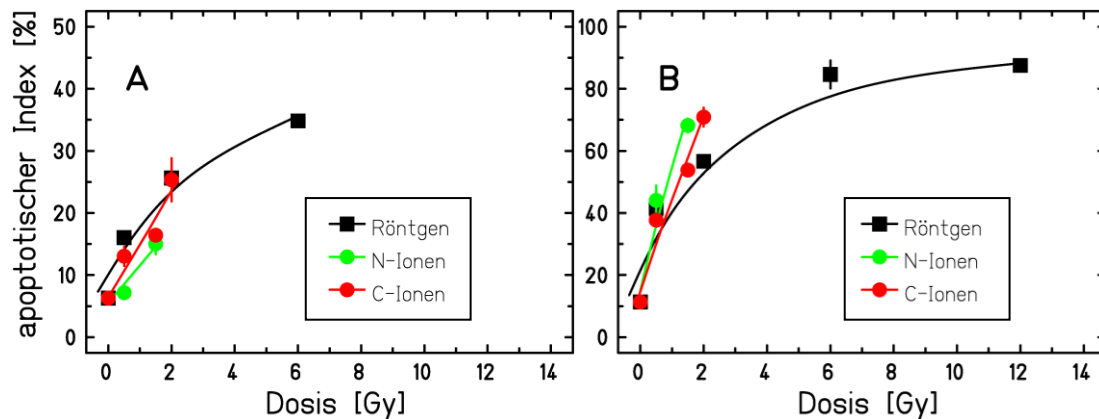


Abb. 22: Induktion von Apoptose in PBL nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung, Stickstoff- bzw. Kohlenstoffionen (N-Ionen LET=70keV/ μ m, C-Ionen LET=168keV/ μ m). Die Messung am Durchflusszytometer erfolgte 24 Stunden (A) und 72 Stunden (B) nach der Bestrahlung. Zur Detektion der Apoptose wurden folgende Methoden verwendet: Annexin-V (Röntgenstrahlung, N-Ionen) und TUNEL (C-Ionen). (SEM bzw. SD, N=1-4, n=2-9)

4.1.2 Einfluss von pro- und anti-inflammatorischen Stimuli auf die Apoptose von PBL

Um einen möglichen Einfluss von pro- oder anti-inflammatorischer Stimulierung auf die Induktion von Apoptose in PBL zu untersuchen, wurden die Zellen direkt nach der Bestrahlung entsprechend stimuliert. Die Ergebnisse der Experimente sind in Abb. 23 dargestellt. Als anti-inflammatorischer Stimulus wurde TGF- β (A) verwendet (5ng/ml). Als pro-inflammatorische Stimuli wurden TNF- α (B) und LPS (C) verwendet (10ng/ml bzw. 1 μ g/ml). Die Konzentrationen wurden analog zu den weiteren Experimenten verwendet und aus bereits publizierten Arbeiten übernommen [24, 62]. Die PBL wurden nach der Bestrahlung für 72 Stunden im Brutschrank inkubiert. Es wurden jeweils die unstimulierten Zellen mit den stimulierten verglichen. Für alle 3 Moleküle konnte keine Veränderung der Apoptose durch die jeweilige Stimulierung festgestellt werden.

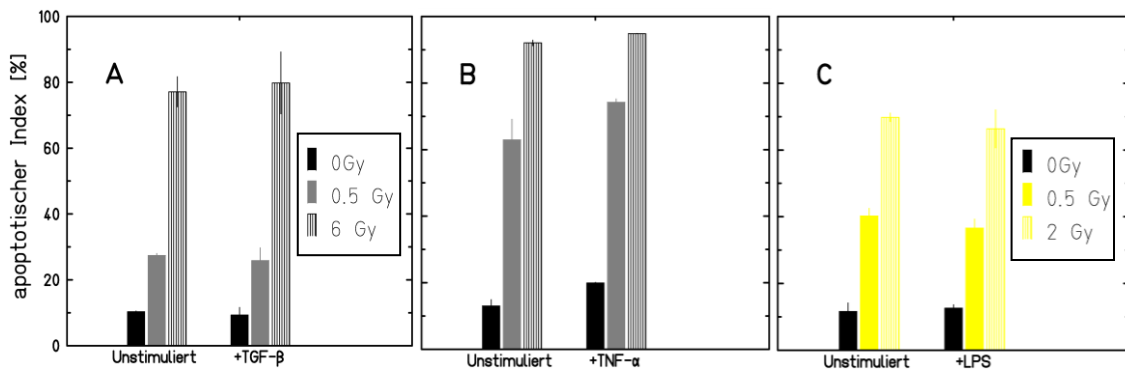


Abb. 23: Einfluss anti- bzw. pro-inflammatorischer Stimulierung auf die Induktion von Apoptose in PBL. Die Stimulierung erfolgte für 72 Stunden mit TGF- β (5ng/ml) (A), TNF- α (10ng/ml) (B) und LPS (1 μ g/ml) (C) nach der Bestrahlung mit Röntgenstrahlung (A+B), Stickstoff- bzw. Kohlenstoffionen (N-Ionen LET=70keV/ μ m, C-Ionen LET=60-85keV/ μ m) (C). Zur Detektion der Apoptose wurden folgende Methoden verwendet: Annexin-V (Röntgenstrahlung, N-Ionen) und TUNEL (C-Ionen). (SEM bzw. SD; A+B: N=1, n=2; C: N=2, n=4)

4.1.3 Induktion von Apoptose in Makrophagen

Um die Frage zu klären, ob auch Zellen der myeloiden Linie²² strahlensensitiv sind, wurden weitere Experimente mit Makrophagen durchgeführt. Für die Messung der Apoptose in Makrophagen wurden die isolierten Monozyten zunächst für 7 Tage ohne zusätzliche Stimulierung kultiviert. In dieser Zeit differenzierten die Monozyten zu Makrophagen aus. Die Überprüfung der Differenzierung erfolgte über eine morphologische Begutachtung.²³ Auch für Makrophagen war keine dosisabhängige Induktion der Apoptose durch Röntgenstrahlung zu beobachten. Die Ergebnisse sind in Abb. 24 dargestellt. Der Anteil apoptotischer Zellen lag für alle Dosen in einem Bereich von 1-2%. Wie für Monozyten ergab sich, dass der Anteil apoptotischer Zellen mit ansteigender Dosis noch deutlicher als für Monozyten abnahm. Dies ist wahrscheinlich auf eine gesteigerte phagozytische Aktivität zurückzuführen.

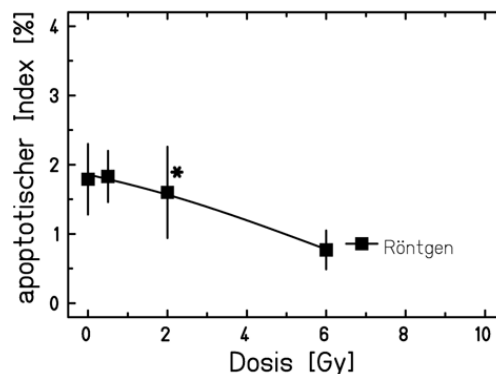


Abb. 24: Induktion von Apoptose in Makrophagen nach Bestrahlung mit Röntgen. Die Messung am Durchflusszytometer erfolgte 24 Stunden nach der Bestrahlung. Zur Färbung der Apoptose wurde die TUNEL Methoden verwendet. (SEM, N=2, n=3-5); *(SD, N=1, n=2)

²² Siehe Kapitel 2.3.2

²³ Siehe Kapitel 3.1.5.2

4.1.4 Induktion von Apoptose in Endothelzellen

Als weitere mögliche *Target*-Zellen für die Induktion der Apoptose durch ionisierende Strahlung wurden Endothelzellen (HUVEC) untersucht. Die Bestrahlungsexperimente wurden zu Beginn mit Röntgenstrahlung durchgeführt. Zusätzlich wurde ein weiteres Experiment an der Microbeam-Bestrahlungseinrichtung der GSI mit beschleunigten Lithiumionen durchgeführt.

Abb. 25 zeigt die Ergebnisse des Microbeam-Experiments im Vergleich von Röntgen- mit Lithiumionen-Bestrahlung. Es ergab sich hier die Möglichkeit, mit einem Mikrostrahl gezielt einzelne Zellen mit einer genau definierten Anzahl an geladenen Teilchen zu bestrahlen. Die Auswertung des Microbeam-Experiments war schwierig, da sich die Endothelzellen nur sehr schlecht in den Microbeamkammern kultivieren ließen und am Ende des Experiments nur noch sehr wenige Zellen zur Auswertung übrig blieben (teilweise nur 23 Zellen pro Kammer).

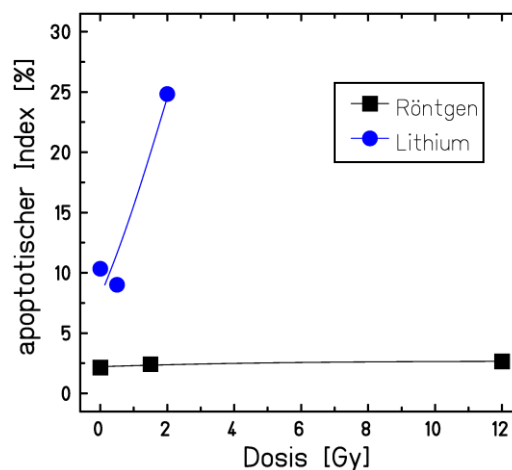


Abb. 25: Induktion von Apoptose in HUVEC nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung oder Lithiumionen (LET=74keV/μm). Die Fixierung und Färbung der Zellen erfolgte 24 Stunden nach der Bestrahlung. Zur Färbung der Apoptose wurde die Annexin-V Methode verwendet. Für die Röntgen-Bestrahlung wurden Ø 3,5 cm Petrischalen verwendet, für die Bestrahlung mit Lithium-Ionen wurden Microbeamkammern verwendet. Ausgezählte Zellen: 678-1162 (Röntgenstrahlung); 27-120 (Lithium). (SD, N=1, n=2).

Es konnte zwar nach der Ionenbestrahlung eine dosisabhängige Steigerung der Apoptose festgestellt werden, allerdings war bereits in den unbestrahlten Kontrollen aufgrund der Kultivierungsbedingungen eine deutlich höhere Apoptoserate im Vergleich zu den Kontrollen des Röntgenexperiments zu beobachten. Außerdem war die Zellzahl in den Proben, die mit 2 Gy bestrahlt wurden, am Ende des Experiments sehr niedrig. In keinem der Röntgenexperimente konnte eine dosisabhängige Steigerung der Apoptose festgestellt werden. Diese Beobachtungen sind in guter Übereinstimmung zu Ergebnissen, die vor kurzem im Rahmen einer Diplomarbeit²⁴ festgestellt wurden.

²⁴ Diplomarbeit von Alexander Helm [63], GSI

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass ausschließlich in PBL eine dosisabhängige Steigerung der Apoptose beobachtet werden konnte. In allen anderen untersuchten Zelltypen konnten keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden. Im Vergleich von dünn- und dicht ionisierender Strahlung, führte die Bestrahlung mit Kohlenstoffionen zu einer stärkeren Steigerung der Apoptose als Röntgenstrahlung. Außerdem wurden auch bereits durch niedrige Dosen deutliche Steigerungen der Apoptose in PBL bewirkt.

4.2 Adhäsion

Die Adhäsion ist ein essentieller Bestandteil der Extravasation von Leukozyten, der bereits wenige Stunden nach dem Beginn einer Infektion/Entzündung auftritt. Die Extravasation ermöglicht es Leukozyten in die verschiedenen Gewebe und Organe des Körpers einzuwandern. Eine Reduktion der einwandernden Leukozyten könnte zu einer Reduktion der lokalen Entzündung führen. Aus diesem Grund wurde der Prozess der Adhäsion als möglicher Wirkungsmechanismus der anti-entzündlichen Wirkung von Niedrigdosis-Bestrahlung im Rahmen dieser Doktorarbeit eingehend untersucht. Als Modellsystem wurde hierbei eine Co-Kultur von Endothelzellen mit PBL verwendet. Unterstützt wurde die Hypothese einer Adhäsionsreduktion, durch Publikationen die das Adhäsionsverhalten von PBL an EA.hy.926 untersuchten [24, 36].

4.2.1 Untersuchung des Adhäsionsverhaltens unter statischen Bedingungen

4.2.1.1 Etablierungsarbeiten

Zu Beginn der Arbeit wurden die Adhäsionsversuche unter statischen Bedingungen nach einem Protokoll aus einer Publikation von Rödel et al. durchgeführt [24]. Im weiteren Verlauf der Arbeiten wurde dieses Protokoll modifiziert, indem die mikroskopische Auswertung der Immunfluoreszenzintensität durch Messungen mit Durchflusszytometrie ersetzt und damit eine schnellere Durchführung mit höherer Statistik ermöglicht wurde.

Die beiden Auswertungsmethoden wurden in mehreren Experimenten verglichen. Dabei wurden EA.hy.926 Zellen und HUVEC verwendet. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Tab. 2 aufgeführt. Es wurden hierbei die Werte aller Proben auf die jeweiligen Positivkontrollen (unbestrahlt, +TNF- α) bezogen. Es zeigte sich in fast allen Experimenten eine gute Übereinstimmung zwischen beiden Auswertungsmethoden. Eine größere Abweichung wurde für HUVEC in den unbestrahlten und unstimulierten Kontrollen beobachtet. Diese Abweichung lässt sich jedoch zum Teil auf die Verwendung von unterschiedlichen Endothelzell- und PBL-Chargen zurückführen, die jeweils von unterschiedlichen Spendern stammten. Es konnte mit beiden Methoden ein deutlicher Unterschied von ca. 40-70% zwischen den Positiv- und Negativkontrollen gemessen werden. Alle weiteren Versuche zum Thema Adhäsionsverhalten wurden mit dem Durchflusszytometer ausgewertet.

Tabelle 2: Vergleich FACS- und mikroskopische Auswertung (statischer Adhäsionstest)

	Dosis [Gy]	Strahlung	Stimulation	Rel. Adhäsion [%]			
				FACS	N(n)	Mikroskop	N(n)
EA.hy.926	0	-	unst.	59 ±4	12(26)	48 ±6	1(2)
HUVEC	0	-	unst.	52 ±7	9(19)	25 ±2	3(6)
	0,5	Stickstoff	+TNF-α	103 ±1	1(2)	96 ±6	1(2)
	2			104 ±1	1(2)	93 ±22	1(2)

Tab. 2: Vergleich der Auswertungsmethoden des statischen Adhäsionstests (Mikroskop vs. FACS). Direkt nach Bestrahlung wurden die Endothelzellen für 24 Stunden +/-TNF-α (1-10ng/ml) inkubiert. Im Anschluss erfolgte der stat. Adhäsionstest. Die Ergebnisse wurden jeweils auf die positiv Kontrollen normiert (100%=unbestrahlt, + TNF-α). Ausgezählte Zellen je Probe: 160-7000 (FACS), 150-1200 (Mikroskop).

Im weiteren Verlauf der Etablierung/Verbesserung des Testsystems wurden Experimente zur Untersuchung der optimalen TNF-α Konzentration durchgeführt. Die ursprünglich verwendete TNF-α Konzentration von 10ng/ml wurde aus dem Protokoll von Rödel et al. entnommen [24]. Um zu überprüfen, welche TNF-α Konzentration optimal für den statischen Adhäsionstest war, wurden mehrere TNF-α Konzentrationen bezüglich ihrer Auswirkung auf die Adhäsion von PBL, miteinander verglichen (0,1; 1; 10ng/ml).

Die Ergebnisse sind in Tab. 3 aufgelistet. Die Proben die mit einer Konzentration von 10ng/ml behandelt wurden, fungierten als Positivkontrolle. Die Werte für alle anderen Proben wurden auf die Positivkontrolle normiert. Es zeigte sich, dass erst bei einer TNF-α Konzentration von 0,1ng/ml eine signifikante Reduktion der Adhäsion im Vergleich zu einer TNF-α Konzentration von 10ng/ml zu beobachten war. Bei einer TNF-α Konzentration von 1ng/ml konnte so gut wie keine Veränderung beobachtet werden. Aus diesem Grund wurde die TNF-α Konzentration in alle weiteren Experimente auf 1ng/ml festgelegt.

Tabelle 3: Vergleich unterschiedlicher TNF-α Konzentrationen

	Stimulation	TNF-α Konzentration [ng/ml]	Rel. Adhäsion [%]	SD
HUVEC	unst.	0	55	8
		0,1	72	2
	+TNF-α	1	95	1
		10	100	0,2

Tab. 3: Vergleich unterschiedlicher TNF-α Konzentrationen bezüglich der Steigerung der Adhäsion von PBL an Endothelzellen im statischen Adhäsionstest. Die Zellen wurden für 24 Stunden +/- TNF-α (0,1-10ng/ml) stimuliert. Anschließend wurde der statische Adhäsionstest durchgeführt. Die Ergebnisse der einzelnen Proben wurden auf die Proben mit der höchsten TNF-α Konzentration normiert (10ng/ml). (N=1, n=2)

4.2.1.2 Adhäsion von PBL an Hybrid-Endothelzellen

Da im Rahmen dieser Arbeit ein möglicher qualitativer Unterschied zwischen Photonen und beschleunigten Ionen untersucht werden sollte, wurden die Experimente zur statischen Adhäsion sowohl mit Röntgenstrahlung als auch mit beschleunigten Kohlenstoffionen durchgeführt.

Alle Ergebnisse dieser Versuche sind in Tab. 4 aufgelistet. Die Ergebnisse für EA.hy.926 Zellen waren in guter Übereinstimmung zu den bereits publizierten Daten. Es konnte hierbei im Vergleich zu den Positivkontrollen (unbestrahlt, +TNF- α) eine Reduktion der Adhäsion der PBL um ca. 30% nach einer Bestrahlung mit 0,5Gy Röntgenstrahlung beobachtet werden. Bei einer Dosis von 6Gy Röntgenstrahlung trat dieser Effekt nicht auf. Es wurde außerdem untersucht, ob sich eine Bestrahlung mit 0,5Gy auch auf unstimulierte Zellen auswirkte. Dies konnte jedoch nicht bestätigt werden.

Im Vergleich der Bestrahlung von Röntgenstrahlung und von Kohlenstoffionen zeigte sich, dass für Kohlenstoffione weder bei einer niedrigen Dosis von 0,5Gy noch bei einer hohen Dosis von 2Gy eine Reduktion der Adhäsion zu beobachten war. Um zu überprüfen, ob der Effekt für Kohlenstoffione nicht in einem anderen Dosisbereich auftrat, wurde eine Dosiseffektkurve nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen erstellt. Die Ergebnisse dieses Experiments sind in Abb. 26 dargestellt. Es konnte weder für Dosen $\leq 0,5$ Gy, noch für höhere Dosen eine Reduktion der Adhäsion durch die Bestrahlung festgestellt werden.

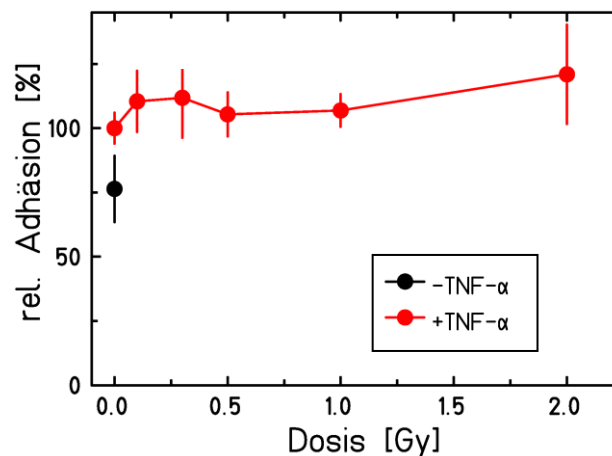


Abb. 26: Dosis abhängige Veränderung der Adhäsion von PBL an EA.hy.926, nach Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen (LET:168keV/ μ m). Direkt nach Bestrahlung wurden die EA.hy.926 für 24 Stunden +/-TNF- α (10ng/ml) inkubiert. Im Anschluss erfolgte der statische Adhäsionstest. Die Ergebnisse wurden jeweils auf die positiv Kontrollen normiert (100%=unbestrahlt, + TNF- α). (SD, N=1, n=2)

Tabelle 4: Adhäsion von PBL an Endothelzellen nach Bestrahlung (statistischer Test)

	Dosis [Gy]	Strahlung	Stimulation	rel. Adhäsion [%]	SEM	N (n)
EA.hy.926	0	-	unst.	59 ¹	4	12 (26)
	0,5	-	unst.	74 ¹	5	4 (8)
	0,5	Röntgen	+TNF-α	71 ¹	8	6 (13)
	6	Röntgen		103	6	3 (7)
	0,5	Kohlenstoff		103	2	2 (4)
	2	Kohlenstoff		121	14	2 (4)
HUVEC	0	-	unst.	52 ¹	7	9 (19)
	0,5	Röntgen	+TNF-α	104	5	4 (8)
	6	Röntgen		131	22	2 (4)
	0,5	Stickstoff		103	1*	1 (2)
	2	Stickstoff		104	1*	1 (2)
	0,5	Kohlenstoff		104	4*	1 (2)
HPAEC	0	-	unst.	53 ¹	2	3 (9)
	0,5	Röntgen	+TNF-α	105	1	2 (6)
	6	Röntgen		107	1	2 (6)
HMVEC	0	-	unst.	48 ¹	3	11 (25)
	0,5	Röntgen	+TNF-α	73 ¹	3	6 (16)
	6	Röntgen		70 ¹	4	5 (13)
	0,5	Kohlenstoff		83 ¹	3	3 (7)
	2	Kohlenstoff		83 ¹	1	3 (6)

¹p≤ 0,03; * Std. Dev.

Tab. 4: Veränderung der Adhäsion von PBL an Endothelzellen, nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung, Kohlenstoffionen (LET:168keV/μm) oder Stickstoffionen (LET:70keV/μm). Direkt nach Bestrahlung wurden die Endothelzellen für 24 Stunden +/-TNF-α (1-10ng/ml) inkubiert. Im Anschluss erfolgte der stat. Adhäsionstest. Die Ergebnisse wurden auf die Positivkontrollen normiert (100%=unbest., +TNF-α).

4.2.1.3 Adhäsion von PBL an HUVEC und HPAEC

Da es sich bei EA.hy.926 um Hybridzellen handelt und diese sich in Ihren Eigenschaften von Gewebezellen stark unterscheiden können, wurden für die weiteren Experimente primäre Endothelzellen ausgesucht. Zu Beginn wurden Endothelzellen aus der Nabelschnur verwendet (HUVEC), da sich diese Zellen aufgrund ihrer einfachen und kostengünstigen Verfügbarkeit sehr gut für Etablierungsarbeiten eignen. Mit HUVEC wurden zunächst die gleichen Versuche wie mit EA.hy.926 durchgeführt. Grundsätzlich konnte eine Steigerung des Adhäsionsverhaltens der PBL nach Stimulierung von HUVEC mit TNF- α um ca. 50% beobachtet werden. Es zeigte sich jedoch, dass HUVEC auf eine Bestrahlung mit 0,5Gy Röntgenstrahlung nicht mit einer Reduzierung der Adhäsion reagierten. Auch bei höheren Dosen war kein Einfluss der Bestrahlung auf das Adhäsionsverhalten zu beobachten. Im Vergleich von Röntgenstrahlung zu beschleunigten Kohlenstoff- und Stickstoffionen zeigte sich ebenfalls keine Wirkung der Bestrahlung.

Im nächsten Schritt wurden weitere primäre Endothelzelltypen für die Experimente ausgewählt. Da die Aufnahme von Radon und seinen Spaltprodukten teilweise über die Lunge abläuft, wurden des Weiteren Endothelzellen aus der pulmonalen Aorta ausgewählt (HPAEC). Auch bei HPAEC konnte eine deutliche Steigerung der Adhäsion durch TNF- α Stimulierung beobachtet werden (ca. 50%). Allerdings zeigte sich wie bei HUVEC keine Veränderung der Adhäsion durch Bestrahlung. Da in den Versuchen mit HUVEC kein Unterschied zwischen der Bestrahlung mit Röntgenstrahlung einerseits und der Bestrahlung mit beschleunigten Ionen andererseits zu beobachten war, wurden für HPAEC keine entsprechenden Versuche durchgeführt.

Um zu überprüfen, ob sich eine Veränderung des Adhäsionsverhaltens in den primären Endothelzellen (HUVEC, HPAEC) erst zu einem späteren Zeitpunkt ereignete, wurden die Inkubationszeiten nach der Bestrahlung verlängert. Da in der Publikation von Gaugler et al. eine Veränderung der Expression der Adhäsionsmoleküle nach Bestrahlung erst nach einem Zeitraum von 6-10 Tagen beschrieben wird, wurde die Kinetik zu diesen Zeitpunkten untersucht [64]. Für die Experimente wurden die Endothelzellen nach der Bestrahlung für 5-8 Tage kultiviert und anschließend der statische Adhäsionstest durchgeführt.

Die Ergebnisse der Versuche sind in Abb. 27 dargestellt. Die TNF- α Stimulierung über 5-8 Tage bewirkte hierbei eine Steigerung der Adhäsion von PBL im Vergleich zur Adhäsion nach 24 Stunden. So wurde der Abstand zwischen Positiv- und Negativkontrollen nach 5-8 Tagen von 50% auf ca. 80% erhöht. Es konnte auch über einen längeren Zeitraum keine Reduktion der Adhäsion festgestellt werden. Durch die Bestrahlung mit 0,5Gy Röntgenstrahlung wurden im beobachteten Zeitraum keine Veränderungen im Vergleich zur Positivkontrolle bewirkt. Bei Bestrahlung mit 6Gy wurde erst nach 7-8 Tagen ein Trend zu einem Anstieg der Adhäsion beobachtet.

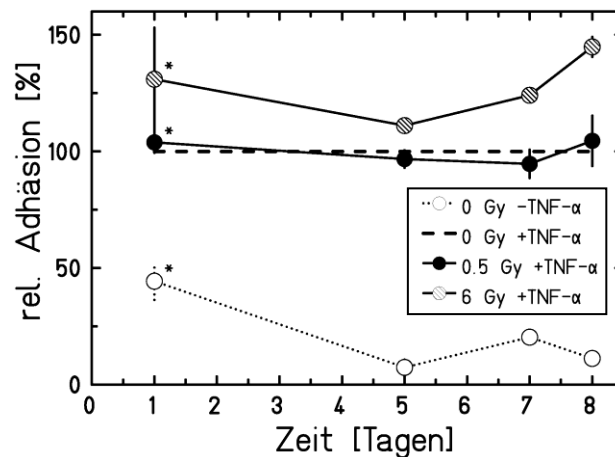


Abb. 27: Adhäsionskinetik nach Röntgenbestrahlung. HUVEC wurden nach Bestrahlung für 1-8 Tage, +/-TNF- α (1ng/ml) kultiviert und im Anschluss der statische Adhäsionstest durchgeführt. Die Ergebnisse wurden auf die positiv Kontrollen normiert (100%=unbestrahlt, + TNF- α). (N=1, n=2) *(N=2-9, n=4-19)

4.2.1.4 Adhäsion von PBL an HMVEC

Ein weiterer Typ von verwendeten primären Endothelzellen stammte aus den mikrovaskulären Gefäßen der Haut (HMVEC). Auch die Haut ist bei einer Radonkur einer erhöhten Strahlenbelastung ausgesetzt, da sich viele Spaltprodukte von Radon als Festkörper auf der Haut absetzen. Mit diesen Zellen wurden die gleichen Experimente wie mit den anderen Endothelzelltypen durchgeführt. Für HMVEC zeigte sich eine Erhöhung der Adhäsion von PBL um ca. 50%, durch eine Stimulierung mit TNF- α . Dies ist vergleichbar zu den anderen getesteten primären Endothelzellen. Anders reagierten HMVEC allerdings auf Bestrahlung, und zwar mit einer Reduktion der Adhäsion um ca. 30% bei einer niedrigen als auch einer hohen Dosis Röntgenstrahlung (0,5Gy und 6Gy). Somit unterschieden sich HMVEC in ihrer Reaktion bezüglich des Adhäsionsverhaltens sowohl von den primären Zelltypen als auch von der Hybrid-Zelllinie, da bei höheren Dosen eine Reduktion der Adhäsion erfolgte.

Im Vergleich von Röntgenstrahlung und beschleunigten Kohlenstoffionen zeigte sich ein leichter Unterschied zwischen beiden Strahlungsarten. So wurde die Adhäsion von PBL nach der Bestrahlung mit Kohlenstoffionen bei einer Dosis von 0,5Gy und 2Gy nur um ca. 20% reduziert. Somit zeigte sich für Photonenstrahlung eine leicht erhöhte Wirksamkeit im Vergleich zur Bestrahlung mit beschleunigten Ionen. Die Überprüfung ergab einen Signifikanzwert von $p \leq 0,03$.

4.2.2 Einfluss von TGF- β auf das Adhäsionsverhalten von PBL

4.2.2.1 Stimulierung von Endothelzellen durch Zugabe von TGF- β

Zur Untersuchung des direkten Einfluss von TGF- β auf die Adhäsion wurden die Endothelzellen nach der Bestrahlung mit TNF- α und/oder TGF- β (1ng/ml) für 24 Stunden stimuliert und im Anschluss der statische Adhäsionstest durchgeführt. Die TGF- β Konzentration wurde aus Experimenten zur intrazellulären TGF- β Signalweiterleitung²⁵ abgeleitet. In diesen Experimenten wurde untersucht bei welcher Konzentration eine Smad-vermittelte Weiterleitung eines TGF- β Signals in den Nukleus detektiert werden konnte. Die Ergebnisse zur Wirkung von TGF- β auf die Adhäsion sind in Tab. 5 aufgelistet und wurden mit allen verwendeten Endothelzelltypen durchgeführt. Es zeigte sich in jedem Experiment und für alle Zelltypen, dass eine Stimulation mit TGF- β und TNF- α keine signifikante Veränderung der Adhäsion im Vergleich zur Stimulation nur mit TNF- α bewirkte. Einzig die Stimulation mit TGF- β alleine bewirkte für HUVEC und HMVEC eine leichte Erhöhung der Adhäsion im Vergleich zu den unstimulierten Negativkontrollen (vgl. mit Tab. 4). Diese Ergebnisse zeigen somit eindeutig sowohl für die primären- als auch für die Hybrid-Endothelzellen, dass durch Zugabe von TGF- β keine Reduktion der Adhäsion von PBL bewirkt werden konnte.

Tabelle 5: Einfluss von TGF- β auf die Adhäsion von PBL an Endothelzellen

	Stimulation	rel. Adhäsion [%]	SEM	N (n)
EA.hy.926	+TGF- β	51	16*	1 (3)
	+TGF- β / +TNF- α	98	12*	1 (3)
HUVEC	+TGF- β	87	6	2 (4)
	+TGF- β / +TNF- α	107	5*	1 (2)
HMVEC	+TGF- β	78	3	3 (7)
	+TGF- β / +TNF- α	100	4	3 (7)
HPAEC	+TGF- β	53	3	3 (9)
	+TGF- β / +TNF- α	104	2	3 (9)

* Std. Dev.

Tab. 5: Einfluss von TGF- β auf die Adhäsion von PBL an Endothelzellen. Die Endothelzellen wurden für 24 Stunden +/-TGF- β (1ng/ml), TNF- α (1ng/ml) inkubiert. Im Anschluss erfolgte der statische Adhäsionstest. Die Ergebnisse wurden auf die positiv Kontrollen (+ TNF- α) normiert.

4.2.2.2 Auswirkung der Inhibierung von TGF- β auf die Adhäsion von PBL

Da von den Primärzellen nur HMVEC auf die Bestrahlung mit einer Verringerung der Adhäsion reagierten, wurden die Neutralisierungsversuche ausschließlich mit diesem Zelltyp durchgeführt. Die Versuche zur Adhäsion wurden sowohl mit Röntgenstrahlung als auch mit beschleunigten Kohlen-

²⁵ Diplomarbeit von Aljona Groo [65]

stoffionen durchgeführt. Die Ergebnisse hierzu sind in Tab. 6 aufgelistet. Im Gegensatz zur direkten Stimulation mit TGF- β konnte durch die Immun-Neutralisierung von TGF- β der Bestrahlungseffekt komplett aufgehoben werden. So bewirkte die Behandlung mit dem Neutralisierungsantikörper nach einer Bestrahlung mit 0,5 oder 6Gy Röntgenstrahlung eine um ca. 30% erhöhte Adhäsion im Vergleich zu den nur mit TNF- α behandelten korrespondierenden Proben (gleiche Dosis). Somit wurde durch die TGF- β Inhibition das Adhäsionslevel wieder auf das Niveau der Positivkontrollen (unbestrahlt, +TNF- α) gebracht. Im Vergleich von Röntgen- und Kohlenstoff-Bestrahlung ergaben sich bezüglich der Wirkung des Neutralisierungsantikörpers keine signifikanten Unterschiede. Die Überprüfung der statistischen Signifikanz der Unterschiede zwischen den Proben die mit dem Neutralisierungsantikörper plus TNF- α und denen die nur mit TNF- α behandelt wurden, ergab einen Signifikanzwert von $p \leq 0,02$, was somit die Aussagekraft der Ergebnisse bestätigte.

Tabelle 6: Einfluss von TGF- β Neutralisierung auf die Adhäsion von PBL an HMVEC

Stimulation	Dosis [Gy]	Strahlung	rel Adhäsion [%]	SEM	N	(n)
unst.	0	-	48	3	11	(25)
+TNF- α	0,5	Röntgen	73 ¹	3	6	(16)
	6		70 ²	4	5	(13)
+TNF- α / +anti-TGF- β	0,5		102 ¹	2	2	(6)
	6		106 ²	5	2	(6)
+TNF- α / +Isotyp	0,5		59	1	2	(6)
	6		49	0,1	2	(6)
+TNF- α	0,5	Kohlenstoff	83	6	3	(7)
	2		83	1	3	(6)
+TNF- α / +anti-TGF- β	0,5		115	18*	1	(3)
	2		104	9*	1	(3)
+TNF- α / +Isotyp	0,5		80	4*	1	(3)
	2		72	9*	1	(3)

^{1/2} $p \leq 0,02$; *Std. Dev.

Tab. 6: Einfluss von TGF- β Neutralisierungsantikörper (anti-TGF- β) auf die Adhäsion von PBL an Endothelzellen (HMVEC). Die Endothelzellen wurden nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung oder Kohlenstoffionen (LET:168keV/ μ m) für 24 Stunden +/-anti-TGF- β (5 μ g/ml), TNF- α (1ng/ml) inkubiert. Im Anschluss erfolgte der statische Adhäsionstest. Die Ergebnisse wurden auf die positiv Kontrollen (+TNF- α) normiert.

4.2.3 Untersuchung des Adhäsionsverhaltens unter dynamischen Bedingungen

Im Zuge der Weiterentwicklung des Adhäsionstests wurde im Rahmen dieser Arbeit ein dynamisches Testsystem etabliert, um damit den Blutstrom in den Blutgefäßen zu simulieren. Die Experimente wurden teilweise in einer Bachelorarbeit ausgeführt, die im Rahmen dieser Arbeit betreut wurde [50]. In der vorliegenden Arbeit wurden die Experimente zum Adhäsionsverhalten unter dynamischen Bedingungen ausschließlich mit HMVEC durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abb. 28 dargestellt. Hierbei wurde das Adhäsionsverhalten von PBL an HMVEC 24 Stunden nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung (0,5 und 6Gy) untersucht. Die Endothelzellen wurden direkt nach der Bestrahlung mit TNF- α (1ng/ml) stimuliert. Es konnte hierbei, analog zu den Experimenten unter statischen Bedingungen, eine deutliche Reduktion der Adhäsion durch die Bestrahlung mit 0,5 und 6Gy beobachtet werden. Durch die Bestrahlung mit 0,5Gy wurde die Adhäsion um 80% im Vergleich zu den Positivkontrollen reduziert, durch Bestrahlung mit 6Gy um 40%. Damit war der Bestrahlungseffekt unter dynamischen Bedingungen weitaus stärker ausgeprägt als unter statischen Bedingungen.

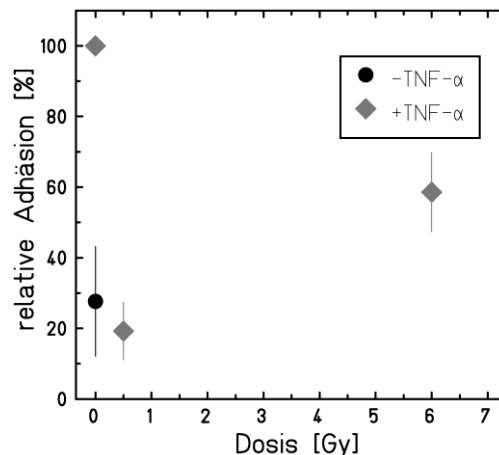


Abb. 28: Veränderung der Adhäsion unter dynamischen Bedingungen von PBL an HMVEC, nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung. Direkt nach Bestrahlung wurden die HMVEC für 24 Stunden +/-TNF- α (1ng/ml) inkubiert. Im Anschluss erfolgte der dynamische Adhäsionstest. Die Ergebnisse wurden jeweils auf die positiv Kontrollen normiert (100%=unbestrahlt, + TNF- α). (SEM/SD, N=1-2, n=2-6)

4.2.4 Freisetzung von Zytokinen von Endothelzellen nach Bestrahlung

Um zu überprüfen, ob für die Veränderung der Adhäsion durch Bestrahlung eventuell eine autokrine Stimulierung der Endothelzellen verantwortlich sein könnte, wurde die Zytokin-Freisetzung der Endothelzellen nach der Bestrahlung mit Röntgenstrahlung oder Kohlenstoff- bzw. Stickstoffionen untersucht. Die Versuche zur Bestimmung der TNF- α und NO Freisetzung wurden ausschließlich mit HUVEC durchgeführt. Es konnte in keinem der Experimente eine Freisetzung von TNF- α und NO sowohl in den unbehandelten als auch in den bestrahlten Proben, detektiert werden. Die Versuche zur Freisetzung von IL-10 wurden mit HMVEC durchgeführt. Auch hier lagen die Konzentrationen in allen Proben, d.h. sowohl nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung als auch nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen, unterhalb der Detektionsgrenze.

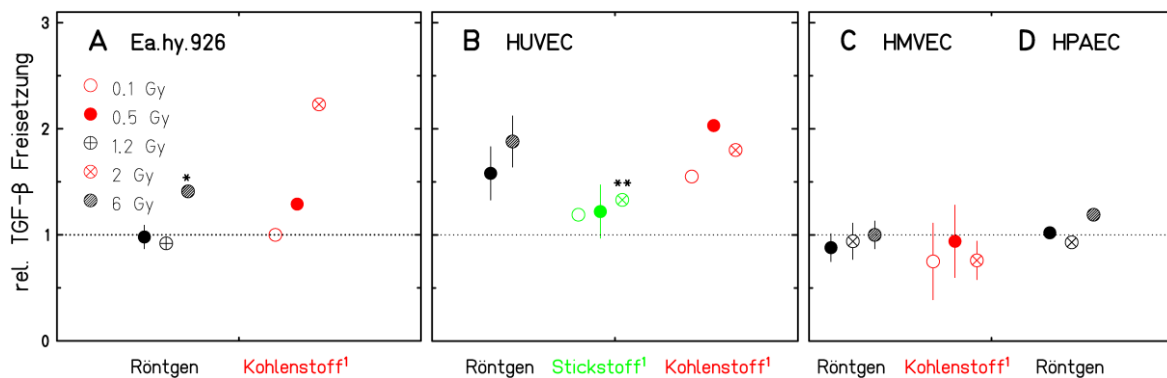


Abb. 29: Freisetzung von TGF- β in Endothelzellen 24 Stunden nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung, Kohlenstoffionen (LET=168keV/ μ m) oder Stickstoffionen (LET=70keV/ μ m). Verwendete Zelltypen: EA.hy.926 (A), HUVEC (B), HMVEC (C), HPAEC (D). Die Ergebnisse für die freigesetzte Menge an TGF- β wurden auf die Kontrollwerte normiert. (A: (SEM) N=2, n=6; B: (SEM) N=3-4, n=7-10 C: (SEM) N=2, n=5; D: (SEM) N=2, n=6)(SD, ¹N=1, n=2; *N=1, n=3; **N=1, n=1)

Nur TGF- β wurde in deutlich messbaren Mengen freigesetzt. Die Versuche hierzu wurden mit allen verwendeten Endothelzelltypen durchgeführt. Es wurde zunächst die Freisetzung des gesamt-TGF- β (aktiv und inaktiv) untersucht. Da in den einzelnen Experimenten Zellen von unterschiedlichen Spendern verwendet wurden, kam es zu größeren Schwankungen der Absolutwerte. Aus diesem Grund wurden die Ergebnisse der einzelnen Proben innerhalb eines Experiments jeweils auf die unbestrahlten Kontrollen normiert und als relative TGF- β Freisetzung zusammengefasst. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abb. 29 dargestellt. In den Experimenten wurde die Wirkung von niedrigen Dosen (0,1-1,2Gy) und höheren Dosen (2Gy Kohlenstoff- bzw. Stickstoffionen und 6Gy Röntgenstrahlung) untersucht. Insgesamt konnte jedoch nur eine moderate Veränderung der TGF- β Freisetzung durch Bestrahlung festgestellt werden.

Für EA.hy.926 wurde nach Röntgenbestrahlung nur eine leichte Erhöhung der TGF- β Freisetzung auf das 1,5fache, hingegen wurde nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen die deutlichste Erhöhung der TGF- β Freisetzung beobachtet (etwa um den Faktor 2,5). Diese strahleninduzierte Veränderung der TGF- β Freisetzung erfolgte für Röntgenstrahlung erst bei einer Dosis von 6Gy und für die Bestrahlung mit Kohlenstoffionen erst bei einer Dosis von 2Gy. Bei niedrigeren Dosen konnte keine signifikante Veränderung festgestellt werden.

HUVEC reagierte sowohl nach Röntgenstrahlung als auch nach Bestrahlung mit Kohlenstoff- bzw. Stickstoffionen mit einer moderaten Steigerung der TGF- β Freisetzung. Für Röntgenstrahlung wurde die Freisetzung bei einer Dosis von 0,5Gy um das 1,5fache und bei einer Dosis von 6Gy um das 1,8fache erhöht. Während bei der Bestrahlung mit Stickstoffionen kein Strahlungseffekt zu beobachten war, konnte nach der Bestrahlung mit Kohlenstoffionen eine Erhöhung der TGF- β Freisetzung um den Faktor 1,5 bereits bei einer Dosis von 0,1Gy beobachtet werden. Bei einer Dosis von 0,5Gy wurde die Freisetzung sogar um den Faktor 2 erhöht. Eine Bestrahlung mit 2Gy konnte jedoch keine weitere Steigerung bewirken.

Sowohl für HMVEC als auch für HPAEC konnten keine signifikanten Strahlungseffekte beobachtet werden. HMVEC reagierten eher mit einer leichten Reduktion der TGF- β Freisetzungen bei niedrigen Dosen (0,1 und 0,5Gy). HPAEC hingegen reagierten eher mit einer leichten Erhöhung der TGF- β Freisetzung bei hohen Dosen (6Gy). Für HMVEC wurde ebenfalls ein Bestrahlungsexperiment mit Kohlenstoffionen durchgeführt. Hierbei konnten keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zur Röntgenbestrahlung beobachtet werden. Sowohl für HMVEC als auch für HUVEC wurde ebenfalls die Freisetzung von aktivem TGF- β untersucht. Hierbei lagen die Konzentrationen jedoch in allen Experimenten unterhalb der Detektionsgrenze.

4.3 Phagozytose von PBL durch Makrophagen

Der Prozess der Phagozytose von apoptotischen Zellen hat neben der Funktion der Aufrechterhaltung der Homöostase wichtige immunregulierende Funktionen. Es konnte in mehreren Arbeiten gezeigt werden, dass die Phagozytose von apoptotischen Zellen eine entzündungshemmende Wirkung auf Makrophagen hat [37, 52]. Allerdings wurde in diesen Publikationen die Apoptose nur mit UV-Licht oder mit chemischen Agenzien induziert. Daher wurde in dieser Arbeit eine mögliche entzündungshemmende Wirkung von ionisierender Strahlung durch Induktion von Apoptose und anschließender Phagozytose untersucht.

4.3.1 Phagozytotische Aktivität von Makrophagen nach Co-Kultivierung mit PBL

Die Experimente zur Untersuchung der phagozytischen Aktivität erfolgten in einem Co-Kultursystem mit humanen Makrophagen und apoptotischen PBL. Die PBL wurden sowohl mit Röntgenstrahlung als auch mit beschleunigten Kohlenstoffionen bestrahlt. Für die Experimente wurden drei verschiedene Makrophagen Subtypen verwendet, die durch unterschiedliche Differenzierung *in vitro* erzeugt wurden.

Die Ergebnisse der Experimente sind in Abb. 30 dargestellt. Aufgetragen ist hierbei die relative phagozytotische Aktivität der Makrophagen, in Relation zur Bestrahlungsdosis der PBL. Verglichen wurde die relative phagozytotische Aktivität nach 20 Stunden Co-Inkubation der Makrophagen mit unbestrahlten oder bestrahlten PBL. Als Bezugswert diente die phagozytotische Aktivität von spontan ausdifferenzierten Makrophagen, die mit unbestrahlten PBL Co-inkubiert wurden.

Es zeigte sich, dass die Makrophagen die durch spontane Differenzierung erzeugt wurden, die höchste phagozytotische Aktivität aufwiesen. Allerdings wurde die phagozytotische Aktivität durch die Co-Inkubation mit apoptotischen PBL nur minimal gesteigert. Der M-CSF Subtyp zeigte für die Co-Inkubation mit unbestrahlten PBL eine um ca. 25% niedrigere phagozytotische Aktivität als die spontan ausdifferenzierten Makrophagen. Allerdings bewirkte eine Co-Inkubation mit apoptotischen PBL eine Steigerung der phagozytotischen Aktivität um ca. 30%. Die niedrigste phagozytotische Aktivität

zeigten der GM-CSF Subtyp. Seine Aktivität war, im Vergleich zu den spontan ausdifferenzierten Makrophagen, nach Co-Inkubation mit unbestrahlten PBL um ca. 35% reduziert. Durch die Co-Inkubation mit apoptotischen PBL wurde die Aktivität nur um ca. 10% gesteigert. Es konnte für den M-CSF und GM-CSF eine signifikante Abhängigkeit der phagozytotischen Aktivität zur Bestrahlungsdosis der PBL beobachtet werden.

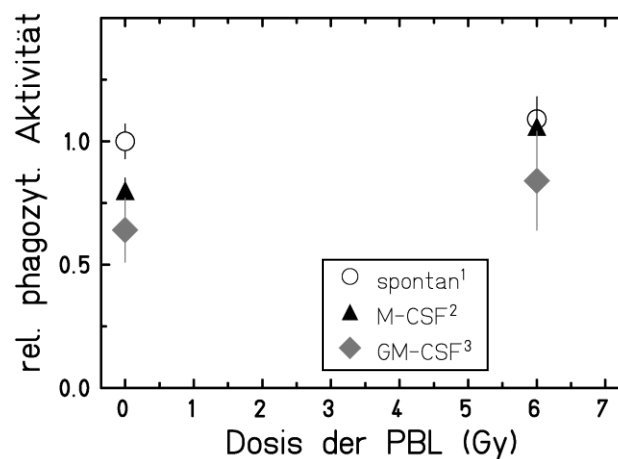


Abb. 30: Relative phagozytotische Aktivität von verschiedenen Makrophagen Subtypen (spontan ausdifferenziert, +M-CSF[20-50ng/ml], GM-CSF[100ng/ml]), in Relation zur Bestrahlungsdosis der PBL. Die Makrophagen sowie die PBL desselben Spenders wurden 7 Tage kultiviert. Die PBL wurden im Anschluss mit Röntgenstrahlung (6Gy) bestrahlt und dann nach 2 Stunden mit den Makrophagen für 20 Stunden co-inkubiert. (SEM, ^{1,3}N=3, n=11; ²N=4, n=15)

Für die in Abb. 30 zusammengefassten Experimente wurden PBL verwendet, die im Vorfeld der eigentlichen Versuche für 7 Tage kultiviert wurden. Da sie aus der gleichen Blutspende stammten wie die Monozyten, die innerhalb von 7 Tagen zu Makrophagen ausdifferenziert wurden. Aus diesem Grund wurde überprüft, ob die lange Inkubationszeit zu einer Steigerung der Apoptose in den PBL führte.²⁶ Es konnte hierbei jedoch nur eine sehr schwache Steigerung (ca. 2-3%) der Apoptose beobachtet werden. Die PBL wurden nach der Bestrahlung zunächst für weitere 2 Stunden im Brutschrank kultiviert, bevor sie auf die Makrophagen gegeben wurden. Die Überprüfung der Apoptose-rate in den PBL ergab eine strahlungsvermittelte Steigerung um ca. 5%, 2 Stunden nach der Bestrahlung (6Gy). Nach 24 Stunden lag der apoptotische Index bei 35% (siehe Kapitel4.1.1). Trotzdem war der Unterschied der phagozytotischen Aktivität zwischen den unbestrahlten und den apoptotischen PBL geringer als ursprünglich angenommen, auf Grundlage der zu erwartenden Apoptose-rate. Aus diesem Grund wurden weitere Experimente zur phagozytotischen Aktivität mit frisch isolierten PBL durchgeführt. Außerdem wurde die Co-Inkubationszeit der Makrophagen und PBL auf 2 Stunden verkürzt. Stattdessen wurden die PBL nach der Bestrahlung zunächst für 20 Stunden als

²⁶ Überprüfung erfolgte mittels Annexin-V Färbung

Monokultur inkubiert, um zunächst eine Steigerung des Apoptoserate zu bewirken. Des Weiteren wurde ein Vergleich zwischen Röntgenstrahlung und beschleunigten Kohlenstoffionen vorgenommen. In beiden Experimenten wurden die Zellen desselben Spenders verwendet.

Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abb. 31 dargestellt. Es zeigte sich, dass die Verwendung von frisch isolierten apoptotischen PBL, in Kombination mit einer verkürzten Co-Inkubationszeit, eine größere Steigerung der phagozytotischen Aktivität bewirkte. Für die Bestrahlung mit Kohlenstoffionen fiel die Steigerung in Abhängigkeit zur Dosis etwas geringer aus. So wurde die phagozytotische Aktivität durch Röntgenstrahlung um 150% erhöht, während nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen (2Gy) nur eine Erhöhung um 50% erreicht wurde.

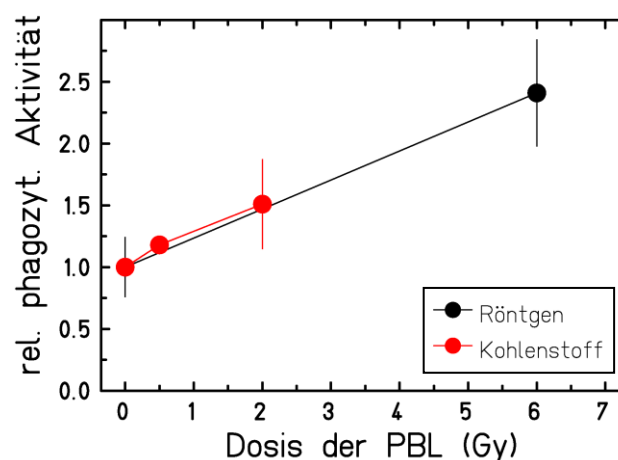


Abb. 31: Relative phagozytotische Aktivität von Makrophagen (+M-CSF[50ng/ml]), in Relation zur Bestrahlungsdosis der PBL. Die Makrophagen wurden 7 Tage kultiviert. Die PBL wurden 24 Stunden vor der Co-Inkubation vom selben Spender isoliert, dann mit Röntgenstrahlung (6Gy), oder mit Kohlenstoffionen (0,5 und 2Gy; LET=60-85keV/μm) bestrahlt und nach 20 Stunden mit den Makrophagen für 2 Stunden co-inkubiert. (SD, N=1, n=2)

4.3.2 Zytokin-Freisetzung nach Co-Kultivierung von Makrophagen und PBL

Neben der Untersuchung der phagozytotischen Aktivität wurde eine mögliche Veränderung der Zytokin-Freisetzung durch die Co-Kultivierung der Makrophagen mit den apoptotischen PBL untersucht. Der Focus wurde hierbei auf die anti-inflammatorischen Zytokine TGF-β und IL-10, sowie auf das pro-inflammatorische Zytokin TNF-α gelegt.

4.3.2.1 Zytokin-Freisetzung durch Monokulturen

Um einen möglichen direkten Einfluss der Bestrahlung zu überprüfen, wurde zunächst die strahleninduzierte Veränderung der Zytokin-Freisetzung in Monokulturen von Monozyten, Makrophagen und PBL untersucht. Ergänzend wurden die Auswirkungen einer pro-inflammatorischen Stimulation mit LPS untersucht. Die Absolutmengen der jeweiligen Zytokin-Freisetzung sind am Ende des Kapitels in Tab. 7 zusammengefasst.

Die Ergebnisse der Zytokin-Freisetzung von Monozyten sind in Abb. 32 dargestellt. Aufgetragen wurde hierbei die relative TGF- β - bzw. TNF- α Freisetzung pro 10^5 Zellen bezogen auf die unbestrahlten und unstimulierten Kontrollen. Durch die Stimulierung mit LPS wurde die TGF- β Freisetzung in den unbestrahlten Kontrollen im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen um ca. 30% erniedrigt. Eine Bestrahlung mit 0,5Gy Röntgenstrahlung bewirkte in unstimulierten Monozyten eine Reduktion der TGF- β Freisetzung um ca. 50%. Die Bestrahlung mit 6Gy führte hingegen zu keiner weiteren Reduktion. In aktivierten Monozyten (+LPS) wurde durch die Bestrahlung die Freisetzung ebenfalls auf ca. 50% des Kontrollwertes (unstimulierte Monozyten) reduziert. In unstimulierten Zellen verursachte eine Bestrahlung mit 0,1 oder 0,5Gy Kohlenstoffionen hingegen keine deutliche Veränderung der TGF- β Freisetzung. Eine Verminderung wurde erst durch eine Bestrahlung mit 2Gy erreicht.

Bezüglich der TNF- α Freisetzung konnte keine signifikante strahleninduzierte Veränderung festgestellt werden. Nur die Stimulierung mit LPS bewirkte eine deutliche Steigerung der TNF- α Freisetzung um das 160fache. Die Bestrahlung mit 6Gy Röntgenstrahlung bewirkte in unstimulierten Monozyten eine geringfügige Steigerung der TNF- α Freisetzung. Es war keine IL-10 Freisetzung in unstimulierten Monozyten zu detektieren, weitere Experimente mit aktivierten Monozyten wurden nicht durchgeführt.

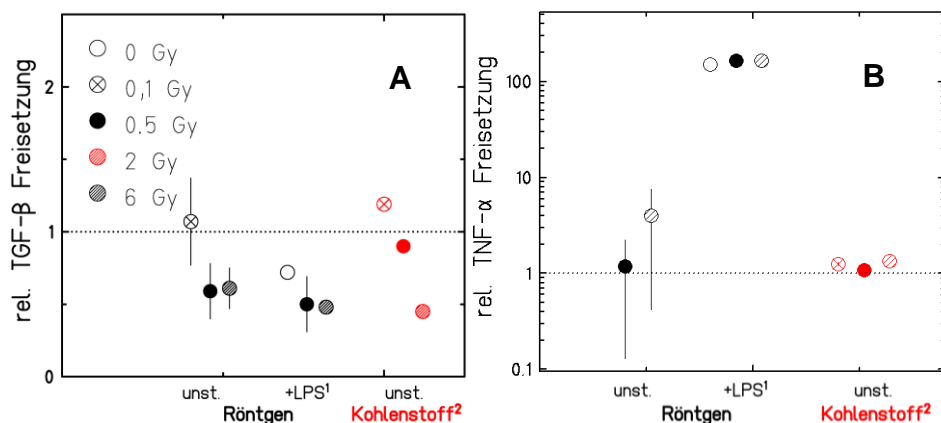


Abb. 32: Freisetzung von TGF- β (A) bzw. TNF- α (B) in Monozyten 24 Stunden nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung oder Kohlenstoffionen (LET=168keV/ μ m), +/- LPS [1 μ g/ml]. Die Ergebnisse für die freigesetzte Menge an TGF- β / TNF- α wurden auf die Kontrollwerte der unstimulierten Monozyten normiert. Die relative TNF- α Freisetzung ist logarithmisch skaliert. (A+B: (SEM) N=3, n=7; (SD) ¹N=1, n=3 ²N=1, n=2)

In Abb. 33 sind die Ergebnisse der TGF- β Freisetzung von Makrophagen nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung oder mit beschleunigten Kohlenstoffionen abgebildet. Hierbei wurden die drei verwendeten Makrophagen Subtypen miteinander verglichen. Es wurden insgesamt zwei Experimente mit Röntgenstrahlung und ein Experiment mit Kohlenstoffionen durchgeführt.²⁷ In den einzelnen Experimenten wurden Zellen von jeweils unterschiedlichen Spendern verwendet. Für GM-CSF Makrophagen wurden deutlich höhere Mengen an freigesetzten TGF- β gefunden als für unstimulierte und M-CSF Makrophagen. Es konnte bei Verwendung von Röntgenstrahlung für keinen Subtyp eine signifikante strahleninduzierte Veränderung der TGF- β Freisetzung beobachtet werden.

Im Gegensatz zur Bestrahlung mit Röntgenstrahlung zeigte sich in unstimulierten Makrophagen durch Bestrahlung mit Kohlenstoffionen für Dosen $\geq 0,1$ Gy zu den Kontrollen eine leichte Erhöhung der TGF- β Freisetzung. Die M-CSF Subtyp zeigte auch nach der Bestrahlung mit Kohlenstoffionen keine Veränderung der TGF- β Freisetzung im Vergleich zu den Kontrollen. Die höchsten Werte für TGF- β Freisetzung wurden wieder für den GM-CSF Subtyp gemessen. Hier zeigte sich nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen eine leichte Erhöhung der TGF- β Freisetzung ausschließlich bei einer Dosis von 0,1Gy. Für höhere Dosen konnte keine Veränderung beobachtet werden.

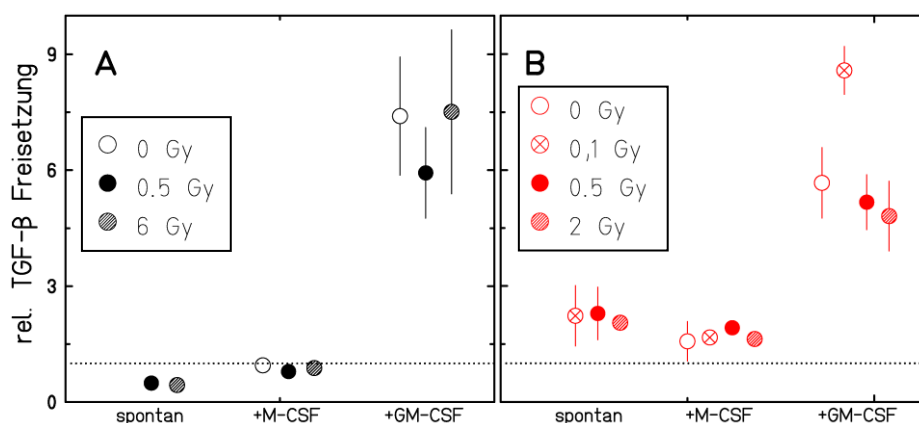


Abb. 33: Freisetzung von TGF- β in Makrophagen 24 Stunden nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung (A) oder Kohlenstoffionen (LET=168keV/ μ m) (B). Die Makrophagen wurden vor der Bestrahlung für 7 Tage kultiviert und +/- M-CSF [20ng/ml] oder GM-CSF [100ng/ml] ausdifferenziert. Die Ergebnisse für die freigesetzte Menge an TGF- β wurden auf die Kontrollwerte der spontan ausdifferenzierten Makrophagen normiert. (A: (SEM) N=2, n=4; B: (SD) N=1, n=2)

In Abb. 34 ist die TNF- α Freisetzung der verschiedenen Makrophagen Subtypen nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung oder mit Kohlenstoffionen abgebildet. Es konnte hierbei für Röntgenstrahlung für keinen Subtyp eine signifikante Veränderung der TNF- α Freisetzung festgestellt werden. Einzig für den GM-CSF Subtyp konnte ein leichter Trend zu einer gesteigerten TNF- α Freisetzung, nach Bestrah-

²⁷ Die Proben aus den drei Experimenten wurden zu Bestimmung der TGF- β , TNF- α und IL-10 Freisetzung verwendet.

lung mit 0,5 oder 6Gy, beobachtet werden. Die Makrophagen des GM-CSF Subtyps wiesen auch im Vergleich zu den anderen Subtypen eine deutlich höhere TNF- α Freisetzung auf. Für die Bestrahlung mit Kohlenstoffionen konnte eine Reduktion der TNF- α Freisetzung (Faktor 2), für eine Dosis von 0,5Gy, nur im GM-CSF Subtyp detektiert werden. Auch für die Dosispunkte 0,1 und 2Gy war eine Reduktion zu beobachten. Allerdings kam es hierbei zu größeren Abweichungen zwischen den einzelnen Messwerten. In den anderen beiden Subtypen konnten keine signifikanten Veränderungen beobachtet werden.

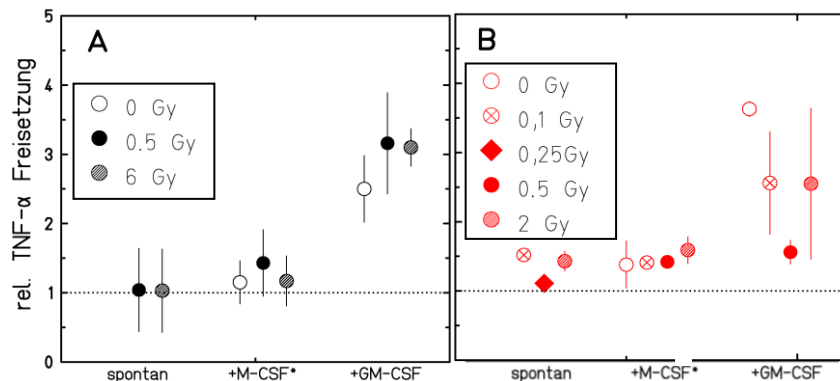


Abb. 34: Freisetzung von TNF- α in Makrophagen 24 Stunden nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung –LPS (A) oder Kohlenstoffionen (LET=168keV/ μ m) +LPS [100ng/ml] (B). Die Makrophagen wurden vor der Bestrahlung für 7 Tage kultiviert und +/- M-CSF [20ng/ml] oder GM-CSF [100ng/ml] ausdifferenziert. Die Ergebnisse für die freigesetzte Menge an TNF- α wurden auf die Kontrollwerte der spontan ausdifferenzierten Makrophagen normiert. (A: (SEM) N=2, n=4; *N=3, n=7; B: (SD) N=1, n=2).

In Abb. 35 ist die Freisetzung von IL-10 der Makrophagen Subtypen nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung oder mit Kohlenstoffionen abgebildet. Es konnte hierbei für keinen Subtyp eine Veränderung der Freisetzung von IL-10 nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung beobachtet werden. Der M-CSF Subtyp und die spontan ausdifferenzierten Makrophagen setzten ungefähr die gleiche Menge IL-10 frei. Der GM-CSF Subtyp wies hingegen die geringste Freisetzung von IL-10 auf (siehe Tab. 7). Durch die Bestrahlung mit Kohlenstoffionen wurde in den spontan ausdifferenzierten Makrophagen eine Steigerung der Freisetzung von IL-10 bewirkt. Hierbei wurde die Freisetzung am stärksten durch eine Dosis von 0,1Gy gesteigert, im Vergleich zur unbestrahlten Probe. Höhere Dosen (0,5 und 2Gy) bewirkten hingegen geringere Steigerungen. Im M-CSF Subtyp bewirkten niedrige Dosen (0,1 und 0,5Gy) nur geringfügige, nicht signifikante Steigerungen. Eine Bestrahlung mit 2Gy bewirkte hingegen eine deutliche Steigerung um das 6fache. Im GM-CSF Subtyp konnten analog zur Bestrahlung mit Röntgenstrahlung, keine signifikanten Veränderungen beobachtet werden. Da jedoch nur ein Bestrahlungsexperiment mit Kohlenstoffionen durchgeführt wurde, kann den Ergebnissen keine hohe Aussagekraft beigemessen werden. Insgesamt wurden durch die unstimulierten Makrophagen jedoch nur geringe Mengen IL-10 freigesetzt (4-50pg).

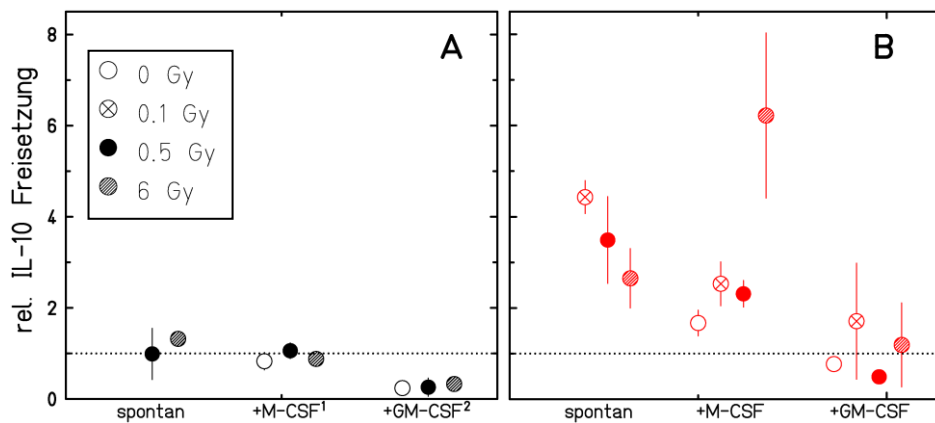


Abb. 35: Freisetzung von IL-10 in Makrophagen 24 Stunden nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung (A) oder Kohlenstoffionen (LET=168keV/ μ m) (B). Die Makrophagen wurden vor der Bestrahlung für 7 Tage kultiviert und +/- M-CSF [20ng/ml] oder GM-CSF [100ng/ml] ausdifferenziert. Die Ergebnisse für die freigesetzte Menge an IL-10 wurden auf die Kontrollwerte der unstimulierten Makrophagen normiert. (A: (SD) N=1, n=2-3; ¹n=3; (SEM/SD) ²N=1-2 n=2-5; ; B: N=1, n=2).

Zum Schluss wurde die Zytokin-Freisetzung durch PBL untersucht. Die Ergebnisse der Experimente sind in Abb. 36 abgebildet. Für diesen Zelltyp wurden nur sehr geringe Mengen an freigesetztem TGF- β detektiert, sowohl für unstimulierte- als auch für aktivierte Zellen. Zudem wurden größeren Schwankungen zwischen den einzelnen Spendern beobachtet. Insgesamt wurden 2 Bestrahlungsexperimente mit Röntgenstrahlung und ein Experiment mit Stickstoffionen durchgeführt. Für all drei Experimente wurden jeweils Zellen von unterschiedlichen Spendern verwendet.

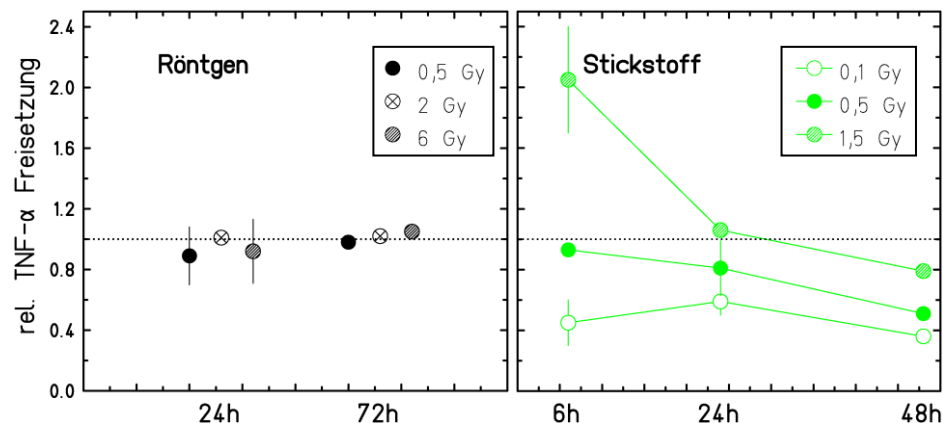


Abb. 36: Freisetzung von TNF- α in PBL 6-72 Stunden nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung oder Stickstoffionen (LET=70keV/ μ m). Die PBL wurden direkt nach Bestrahlung mit LPS [1 μ g/ml] stimuliert. Die Ergebnisse für die freigesetzte Menge an TNF- α wurden auf die Kontrollwerte normiert. (Röntgenstrahlung: N=1-2, n=2-4; Stickstoff: N=1, n=2)

Eine TNF- α Freisetzung erfolgte nur durch eine Stimulierung mit LPS, wobei auch durch die Stimulation nur eine geringe Menge (100-130pg) freigesetzt wurde. Die Freisetzung wurde hierbei in einem Zeitraum von 6-72 Stunden untersucht. Für Röntgenstrahlung konnte keine strahleninduzierte Veränderung der TNF- α Freisetzung beobachtet werden, weder nach 24 noch nach 72 Stunden. Da in dem Zeitraum der hier präsentierten Arbeit nur eine begrenzte Zahl an Bestrahlungsexperimenten

mit Kohlenstoffionen möglich war, wurden zusätzlich Bestrahlungsexperimente mit Stickstoffionen durchgeführt. Da Stickstoff nur um eine Ordnungszahl größer ist als Kohlenstoff, war es möglich für die Bestrahlungen Stickstoffionen, mit einem ähnlichen Energieniveau und LET, zu verwenden. Eine Bestrahlung mit Stickstoffionen (0,1Gy) bewirkte eine leichte Reduktion der TNF- α Freisetzung um ca. 50%, die auch im beobachteten Zeitraum relativ konstant blieb. Eine Bestrahlung mit 0,5Gy bewirkte erst nach 48 Stunden eine Reduktion um ca. 50%. Durch eine Bestrahlung mit 1,5Gy konnte nach 6 Stunden eine leichte Erhöhung der TNF- α Freisetzung um ca. 100% beobachtet werden. Nach 24 Stunden waren die Werte jedoch wieder auf das Kontrollniveau zurückgegangen. Da es sich bei diesen Ergebnissen nur um ein Experiment handelt, könnte es sich jedoch auch nur um eine spenderbedingte Variation handeln. In unstimulierten PBL war keine Freisetzung von IL-10 zu detektieren, weitere Experimente mit aktivierten PBL wurden nicht durchgeführt. In Tabelle 7 sind die Ergebnisse der einzelnen Ergebnisse bezüglich der Zytokin-Freisetzung von Monozyten, Makrophagen und PBL nochmals zusammenfassend dargestellt. Es sind hierbei die jeweiligen Veränderungen durch die Bestrahlung und/oder Stimulierung sowie die freigesetzten Absolutmengen pro 10^5 Zellen des entsprechenden Zytokins angegeben.

Tabelle 7: Zusammenfassung der Zytokin-Freisetzung nach Bestrahlung der Monokulturen

Zelltyp	Strahlung	Stimulierung	Veränderungen/Absolutmenge [pg]					
			TGF- β		TNF- α		IL-10	
Monozyten	Röntgen	unst.	↘	28-50	→	2-7-	ND	-
		+LPS	→	22-34	→	270-300	NB	-
	Kohlenstoff	unst.	↘	90-230	→	4-11	NB	-
Makrophagen	Röntgen-LPS	spontan	↘	20-47	→	3-4	→	10-14
		M-CSF	→	37-45	→	4-5	→	9-11
		GM-CSF	↘/→	280-356	↗	9-12	→	2-3
	Kohlenstoff	spontan	↗	350-790	↗/→	1,4-2,4*	↗	7-34
		M-CSF	→	540-660	→	1,9-2,2*	→/↗	13-48
		GM-CSF	↗/→	790-1500	↓	2,2-5,1*	→	4-13
PBL	Röntgen	unst.	→	0-40	ND	-	ND	-
		+LPS	→		→	115-190	NB	-
	Stickstoff	unst.	ND	-	ND	-	NB	-
		+LPS	ND	-	↘/↗	20-125	NB	-

*Absolutmenge in [ng], Experiment +LPS [100ng/ml]

Tab. 7: Zusammenfassung der Ergebnisse zur Zytokin-Freisetzung von Monozyten, Makrophagen und PBL nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung, Kohlenstoffionen (LET=168keV/ μ m) oder Stickstoffionen (LET=70keV/ μ m). Leichte Reduktion (↘; Faktor 0,4-1,5), starke Reduktion (↓; Faktor \geq 1,6), keine Veränderung (→; Faktor \leq 0,3), leichter Anstieg (↗; Faktor 0,4-1,5), nicht detektierbar (ND), nicht bestimmt (NB). Angegeben sind die freigesetzten Absolutmengen pro 10^5 Zellen des jeweiligen Zytokins in [pg].

4.3.2.2 TGF- β und TNF- α Freisetzung der Co-Kulturen

Im nächsten Schritt wurde die TGF- β und TNF- α Freisetzung nach der Co-Kultivierung von Makrophagen mit PBL untersucht, in denen durch Bestrahlung (Röntgenstrahlung oder Kohlenstoffionen) Apoptose induziert worden war. Die Bestimmung der Freisetzung erfolgte hier in allen Experimenten nach 20 Stunden. Die Ergebnisse wurden für alle Experimente auf die Werte der Monokulturen von spontan ausdifferenzierten Makrophagen normiert. In Tab. 8 ist der Rohdatenbereich der Freisetzung von TGF- β , TNF- α und IL-10 der Co-Kulturen zusammengefasst. Hierbei wurde der Bereich der Freisetzung des jeweiligen Zytokins pro 10^5 Zellen in [pg] angegeben. Die Daten in der Tabelle beziehen sich auf Abb. 37 bis Abb. 41.

Tabelle 8: Rohdatenbereich der Zytokin-Freisetzung der Co-Kulturen

Subtyp	Strahlung	Stimulation	TGF- β [pg]	TNF- α [pg]	IL-10 [pg]
spontan	Röntgen	-LPS	203-214	0,5-138	49-63
		+LPS	117-274	3034-3330	1400-1540
GM-CSF	Röntgen	-LPS	282-342	78-407	2-79
		+LPS	315-450	3230-3560	350-380
M-CSF	Röntgen	-LPS	155-180	5-144	71-1550
		+LPS	120-200	1970-3000	2240-2840
	Kohlenstoff	-LPS	180-243	5-12	2-44
		+LPS	190-215	2440-2760	566-1470

Tab. 8: Rohdatenbereich der Zytokin-Freisetzung der Co-Kulturen von Makrophagen und unbestrahlten/apoptotischen PBL. Die PBL wurden mit Röntgenstrahlung oder Kohlenstoffionen (LET=168keV/ μ m) bestrahlt. Angegeben ist der Bereich der freigesetzten Zytokine: TGF- β , TNF- α und IL-10 pro 10^5 Zellen in [pg].

In Abb. 37 sind die Ergebnisse für die Freisetzung von TGF- β in den drei Subtypen dargestellt. Es wurden insgesamt drei Experimente mit Röntgenstrahlung durchgeführt. In allen drei Experimenten wurden Zellen von jeweils unterschiedlichen Spendern verwendet.²⁸ Der GM-CSF Subtyp zeigte in allen Experimenten die höchste TGF- β Freisetzung. Es konnte allerdings für keinen Subtyp im Vergleich zur Monokultur eine signifikante Veränderung der TGF- β Freisetzung durch eine Co-Kultivierung mit PBL beobachtet werden. Eine Stimulierung der Monokulturen der spontan ausdifferenzierten Makrophagen und des M-CSF Subtyps mit LPS bewirkte, wie bereits bei Monozyten beobachtet (s. Abb. 32A), eine Reduktion der TGF- β Freisetzung um ca. 20-50% im Vergleich zur unstimulierten Monokultur. Durch die Co-Kultivierung mit PBL wurde die Freisetzung wieder auf das Kontrollniveau gesteigert. Es konnte hierbei allerdings in keinem Experiment ein signifikanter Unterschied zwischen der Co-Kultivierung mit unbestrahlten- oder bestrahlten PBL beobachtet werden. Für den GM-CSF Subtyp konnte keine signifikante Veränderung durch die LPS Stimulierung beobachtet werden.

²⁸ Die Proben aus den drei Experimenten wurden zu Bestimmung der TGF- β , TNF- α und IL-10 Freisetzung verwendet.

tet werden. Es wurde des Weiteren noch eine mögliche Aktivierung von TGF- β untersucht. Allerdings lag die Konzentration von aktivem TGF- β in allen Experimenten unterhalb der Detektionsgrenze.

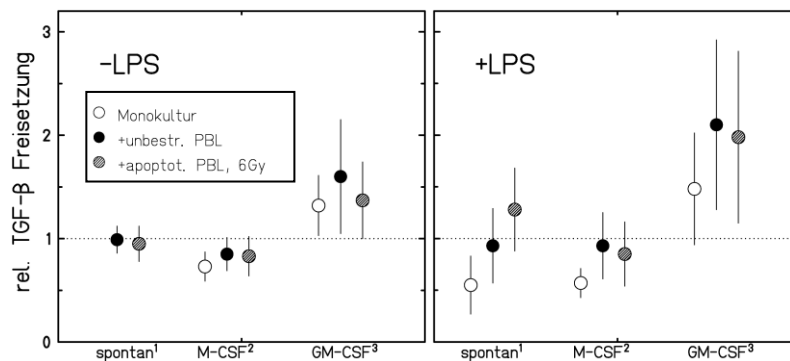


Abb. 37: Freisetzung von TGF- β in Makrophagen 20 Stunden nach Co-Inkubation mit unbestrahlten- oder apoptotischen PBL. Apoptose wurde in PBL durch Bestrahlung mit 6Gy Röntgenstrahlung induziert, außerdem wurden sie ohne oder mit LPS [0,1 μ g/ml] stimuliert. Die Makrophagen wurden vor der Behandlung für 7 Tage kultiviert und entweder spontan oder durch Zugabe von M-CSF [50ng/ml] oder GM-CSF [100ng/ml] ausdifferenziert. Als Kontrollen wurden Monokulturen spontan ausdifferenzierter Makrophagen mitgeführt. Die Ergebnisse für die freigesetzte Menge an TGF- β wurden auf die Kontrollwerte der spontan ausdifferenzierten Makrophagen normiert. (-LPS: (SEM) ^{1,3}N=3, n=7; ²N=5, n=11; +LPS: (SEM) ^{1,3}N=2, n=4; ²N=4, n=8)

In Abb. 38 ist die Freisetzung von TNF- α gezeigt. Sie ist normiert auf die Werte der Monokultur des GM-CSF Subtyps, da für die unbehandelten Monokulturen der beiden anderen Subtypen keine TNF- α Freisetzung detektiert werden konnte. Durch die Co-Kultivierung ohne zusätzliche LPS Stimulierung wurde die Freisetzung in den spontan ausdifferenzierten Makrophagen und im M-CSF Subtyp auf das Niveau des GM-CSF Subtyps gesteigert. Für den GM-CSF Subtyp konnte eine Steigerung der TNF- α Freisetzung um das 5fache nach einer Co-Kultivierung mit unbestrahlten PBL beobachtet werden. Allerdings kam es hierbei zwischen den Messwerten der jeweiligen Spender zu größeren Abweichungen.

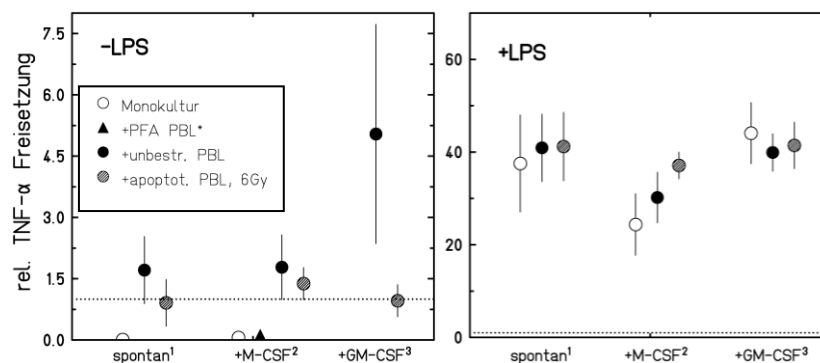


Abb. 38: Freisetzung von TNF- α in Makrophagen 20 Stunden nach Co-Inkubation mit unbestrahlten- oder apoptotischen PBL. Apoptose wurde in PBL durch Bestrahlung mit 6Gy Röntgenstrahlung induziert, außerdem wurden sie ohne oder mit LPS [0,1 μ g/ml] stimuliert. Die Makrophagen wurden vor der Behandlung für 7 Tage kultiviert und entweder spontan oder durch Zugabe von M-CSF [50ng/ml] oder GM-CSF [100ng/ml] ausdifferenziert. Als Kontrollen wurden Monokulturen spontan ausdifferenzierter Makrophagen mitgeführt. Die Ergebnisse für die freigesetzte Menge an TGF- β wurden auf die Kontrollwerte der GM-CSF stimulierten Makrophagen (-LPS) normiert. (-LPS: (SEM) ^{1,3}N=3, n=6-7; ²N=5, n=9-11; (SD) *N=1, n=2; +LPS: (SEM) ^{1,3}N=2, n=4; ²N=4, n=8)

Um zu überprüfen, ob es zu einer aktiven Kommunikation zwischen Makrophagen und PBL während der Co-Kultivierung kam, wurden PFA fixierte PBL als Negativkontrolle verwendet. Es zeigte sich, dass die TNF- α Freisetzung in den Co-Kulturen mit den PFA fixierten PBL wieder auf dem Niveau der Monokulturen lag. Durch eine Stimulierung mit LPS wurde die TNF- α Freisetzung für die spontan ausdifferenzierten Makrophagen und den GM-CSF Subtyp etwa um das 40fache gesteigert. Es konnten allerdings keine Veränderungen der Freisetzung durch die Co-Kultivierung festgestellt werden. Die Monokultur des M-CSF Subtyps zeigte im Vergleich zu den anderen Subtypen eine nur um das 25fache niedrigere Steigerung. Allerdings bewirkte die Co-Kultivierung in diesem Subtyp eine Steigerung der Freisetzung auf das 30fache für unbestrahlte PBL bzw. auf das 40fache für apoptotische PBL.

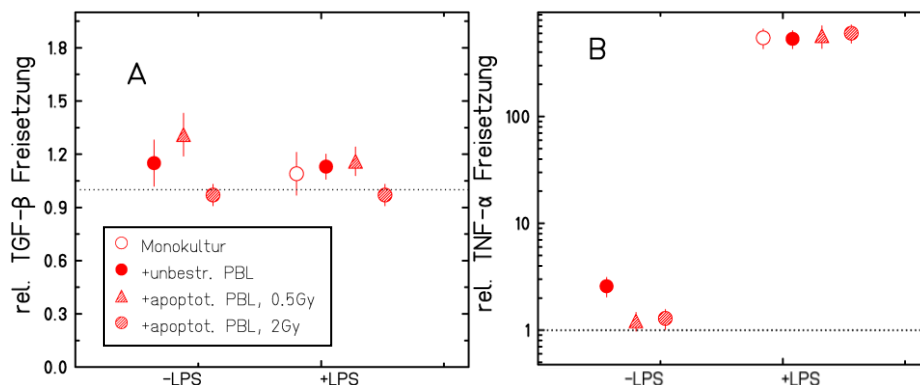


Abb. 39: Freisetzung von TGF- β (A) und TNF- α (B) in Makrophagen, 20 Stunden nach Co-Inkubation mit unbestrahlten- oder apoptotischen PBL. Apoptose wurde in PBL durch Bestrahlung mit 0,5 bzw. 2Gy Kohlenstoffionen (LET= 60-85keV/ μ m) induziert, außerdem wurden sie ohne oder mit LPS [0,1 μ g/ml] stimuliert. Die Makrophagen wurden vor der Behandlung für 7 Tage kultiviert und mit M-CSF [50ng/ml] stimuliert. Die Ergebnisse für die freigesetzte Menge an TGF- β bzw. TNF- α wurden auf die Kontrollwerte der Monokulturen (-LPS) normiert. Die relative TNF- α Freisetzung ist logarithmisch skaliert. (A+B: (SEM) N=2, n=4)

In Abb. 39 sind die Ergebnisse der TGF- β und TNF- α Freisetzung nach Bestrahlung der PBL mit Kohlenstoffionen abgebildet, normiert auf die unbehandelten Monokulturen. Die Bestrahlungsexperimente mit beschleunigten Ionen wurden ausschließlich mit dem M-CSF Subtyp durchgeführt, da die beiden anderen Subtypen nur in sehr geringem Maße auf die Co-Kultivierung reagierten. Es wurden zwei Experimente mit unterschiedlichen Spendern durchgeführt. Im Gegensatz zu den Experimenten mit Röntgenstrahlung wurden die PBL mit zwei verschiedenen Dosen bestrahlt (0,5 und 2Gy). Vergleichbar mit der Bestrahlung mit Röntgenstrahlung zeigte sich keine Veränderung der TGF- β Freisetzung durch die Co-Kultivierung, auch nicht nach einer zusätzlichen Stimulierung mit LPS. Auch für TNF- α konnte keine Veränderung der Freisetzung durch die Co-Kultivierung festgestellt werden. Wie schon in Monokulturen beobachtet (s. Abb. 34) zeigte sich nur durch die Stimulierung mit LPS die Freisetzung deutlich erhöht im Verhältnis zu den unstimulierten Zellen.

4.3.2.3 IL-10 Freisetzung der Co-Kulturen

Als weiteres anti-inflammatorisches Zytokin wurde die Freisetzung von IL-10, ebenfalls nach einer 20stündigen Co-Inkubation von Makrophagen und PBL untersucht. Es wurden hierbei 3 Experimente mit Röntgenstrahlung und mit allen drei Subtypen durchgeführt. Mit dem M-CSF Subtyp wurden insgesamt 10 Experimente mit Röntgenstrahlung durchgeführt. Hierbei wurden in allen Experimenten Zellen von jeweils unterschiedlichen Spendern verwendet.

In Abb. 40 sind die Werte für die Freisetzung von IL-10 dargestellt. Hierbei konnte ohne eine zusätzliche Stimulation mit LPS keine Veränderung der Freisetzung von IL-10 in den drei Subtypen beobachtet werden. Einzig in zwei Experimenten konnte für den M-CSF Subtyp durch die Co-Kultivierung mit PBL eine deutliche Steigerung der Freisetzung von IL-10 um das 32fache beobachtet werden. Es war dabei kein Unterschied zwischen der Co-Kultivierung mit unbestrahlten- oder bestrahlten PBL festzustellen. Die beiden Experimente wurden mit Zellen von jeweils unterschiedlichen Spendern durchgeführt. Allerdings wurde in drei weiteren Experimenten mit jeweils unterschiedlichen Spendern keine Veränderung der Freisetzung von IL-10 beobachtet.

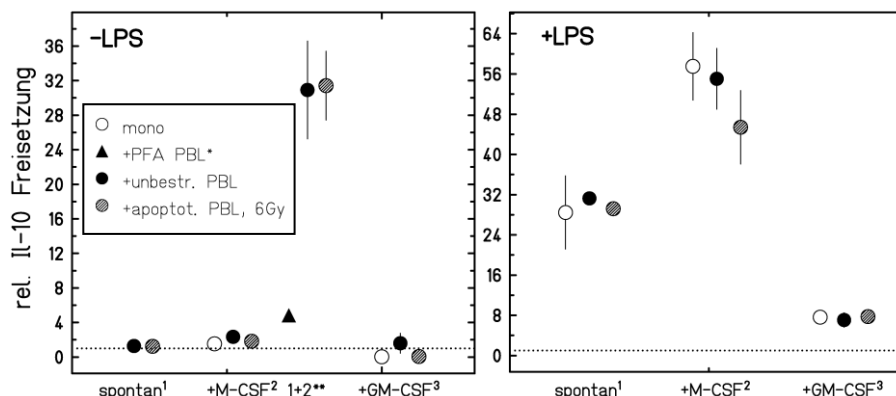


Abb. 40: Freisetzung von IL-10 in Makrophagen 20 Stunden nach Co-Inkubation mit unbestrahlten- oder apoptotischen PBL. Apoptose wurde in PBL durch Bestrahlung mit 6Gy Röntgenstrahlung induziert, außerdem wurden sie ohne oder mit LPS [0,1µg/ml] stimuliert. Die Makrophagen wurden vor der Behandlung für 7 Tage kultiviert und entweder spontan oder durch Zugabe von M-CSF [50ng/ml] oder GM-CSF [100ng/ml] ausdifferenziert. Die Ergebnisse für die freigesetzte Menge an IL-10 wurden auf die Kontrollwerte der spontan ausdifferenzierten Makrophagen normiert. Die M-CSF stimulierten Makrophagen (-LPS) wurden in 2 Gruppen (1+2) unterteilt, aufgrund einer starken spenderabhängigen Variation der Reaktion auf die Co-Inkubation. (-LPS: (SEM) ¹N=3, n=7; ²N=3-10, n=7-21; ³N=2, n=5; (SD) *N=1, n=2; **N=2, n=4; +LPS: (SD) ^{1,3}N=1, n=2; (SEM) ²N=4-5, n=8-12)

In den Experimenten in denen eine Steigerung der Freisetzung von IL-10 zu beobachten war, wurden PFA fixierte PBL zusätzlich als Negativkontrolle verwendet. Es zeigte sich, dass durch die PFA fixierten PBL keine Steigerung der Freisetzung von IL-10, im Vergleich zur Monokultur, bewirkt wurde. Durch die Stimulation mit LPS wurde die Freisetzung von IL-10 in allen Subtypen gegenüber den unstimulierten Zellen erhöht. Am geringsten fiel die Steigerung im GM-CSF Subtyp aus (um das 8fache). In den spontan ausdifferenzierten Makrophagen bewirkte die LPS Stimulation eine Steigerung um das

30fache und im M-CSF Subtyp sogar um das 55fache. In den spontan ausdifferenzierten Makrophagen und im GM-CSF Subtyp wurden durch die Co-Kultivierung keine Veränderung der Freisetzung von IL-10 bewirkt. Hingegen im M-CSF Subtyp ergab sich durch die Co-Kultivierung mit bestrahlten PBL ein Trend zu einer Abnahme der Freisetzung von IL-10 im Vergleich zur Monokultur und zur Co-Kultivierung mit unbestrahlten PBL.

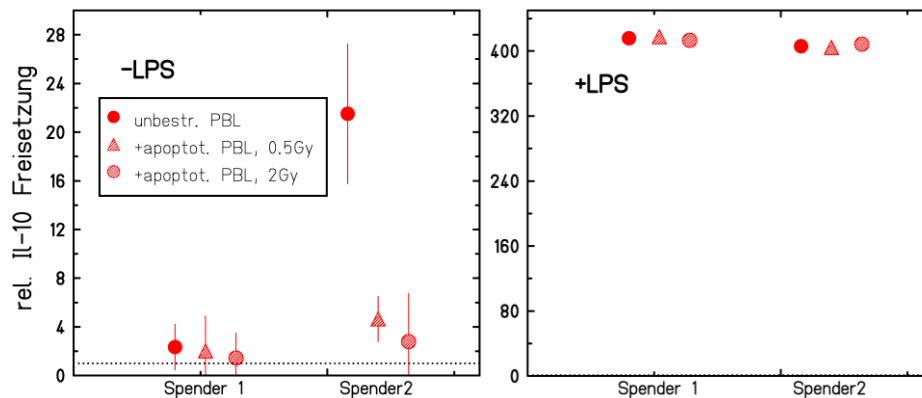


Abb. 41: Freisetzung von IL-10 in Makrophagen 20 Stunden nach Co-Inkubation mit unbestrahlten- oder apoptotischen PBL. Apoptose wurde in PBL durch Bestrahlung mit 0,5 bzw. 2Gy Kohlenstoffionen (LET= 60-85keV/ μ m) induziert, außerdem wurden sie ohne oder mit LPS [0,1 μ g/ml] stimuliert. Die Makrophagen wurden vor der Behandlung für 7 Tage kultiviert und mit M-CSF [50ng/ml] stimuliert. Als Kontrollen wurden Monokulturen der Makrophagen mitgeführt. Die Ergebnisse für die freigesetzte Menge an IL-10 wurden auf die Kontrollwerte der Monokulturen (-LPS) normiert Aufgrund einer starken spenderabhängigen Variation der Reaktion auf die Co-Inkubation wurden die Ergebnisse der beiden Spender separat aufgetragen. (SD, N=1, n=2)

In Abb. 41 sind die Ergebnisse der Bestrahlungsexperimente mit Kohlenstoffionen abgebildet. Für die Experimente wurden Zellen von zwei unterschiedlichen Spendern verwendet. Die Experimente wurden ebenfalls ohne- und mit zusätzlicher LPS Stimulierung durchgeführt. Die PBL wurden mit 2 unterschiedlichen Dosen bestrahlt (0,5 und 2Gy). Für Spender 1 war keine Veränderung der Freisetzung von IL-10 zu beobachten, sowohl ohne- als auch mit LPS Stimulierung. Für Spender 2 war hingegen auch ohne zusätzliche LPS Stimulierung eine deutliche Steigerung der Freisetzung von IL-10 um das 22fache nach der Co-Kultivierung mit unbestrahlten PBL zu beobachten. Die bestrahlten PBL bewirkten im Vergleich zu den unbestrahlten jedoch keine zusätzliche Änderung der Freisetzung von IL-10. Sowohl Spender 1 und 2 zeigten nach Stimulierung mit LPS keine Veränderung der Freisetzung von IL-10 durch die Co-Kultivierung mit PBL im Vergleich zu den Monokulturen.

4.3.2.4 Zytokin-Freisetzung nach Co-Inkubation mit frisch isolierten PBL und TNF- α Stimulierung

Um zu überprüfen, ob die verlängerte Kultivierungsdauer der PBL von 7 Tagen eine Veränderung der Zellen bewirkte und damit auch die Freisetzung der Zytokine beeinflussen könnte, wurden weitere Experimente durchgeführt. Zuerst wurden die PBL vom gleichen Spender erst 24 Stunden vor der Bestrahlung frisch isoliert und mit länger kultivierten PBL verglichen. Des Weiteren wurde der Einfluss einer alternativen pro-inflammatorischen Stimulierung mit TNF- α untersucht, wobei ausschließlich die Freisetzung von TGF- β und IL-10 untersucht wurden. Es wurden hierzu jeweils 2 Experimente

mit Röntgenstrahlung oder Kohlenstoffionen durchgeführt. Die Röntgenexperimente wurden mit Zellen vom gleichen Spender durchgeführt, die Experimente mit Kohlenstoffionen mit unterschiedlichen Spendern. In Tab. 9 ist der Rohdatenbereich der Freisetzung von TGF- β und IL-10 der Co-Kulturen zusammengefasst. Hierbei wurde der Bereich der Freisetzung des jeweiligen Zytokins pro 10^5 Zellen in [pg] angegeben. Die Daten in der Tabelle beziehen sich auf Abb. 42 und Abb. 43.

Tabelle 9: Rohdatenbereich der Zytokin-Freisetzung der Co-Kulturen

Subtyp	Strahlung	Stimulation	TGF- β [pg]	IL-10 [pg]
M-CSF	Röntgen	-TNF- α	190-222	30-324
		+TNF- α	144-255	285-385
	Kohlenstoff	-TNF- α	144-203	32-40
		+TNF- α	132-150	113-165

Tab. 9: Rohdatenbereich der Zytokin-Freisetzung der Co-Kulturen von Makrophagen und unbestrahlten/apoptotischen PBL. Die PBL wurden mit Röntgenstrahlung oder Kohlenstoffionen (LET=168keV/ μ m) bestrahlt. Angegeben ist der Bereich der freigesetzten Zytokine: TGF- β und IL-10 pro 10^5 Zellen in [pg].

In Abb. 42 sind die Ergebnisse der TGF- β Freisetzung abgebildet. Es zeigte sich, dass die TGF- β Freisetzung durch die frisch isolierten PBL im Vergleich zu den länger kultivierten PBL nicht verändert wurde. Durch die Stimulierung mit TNF- α wurde in den Monokulturen eine Reduktion der TGF- β Freisetzung um 20% bewirkt. Durch die Co-Kultivierung wurde die Freisetzung jedoch wieder gesteigert. Hierbei fiel die Steigerung für die Co-Kultivierung mit den bestrahlten PBL (6Gy Röntgenstrahlung) etwas niedriger aus als für die unbestrahlten und sieben Tage alten PBL. Durch die Bestrahlung der PBL mit Kohlenstoffionen (sowohl für 0,5 als auch für 2 Gy) konnten keine signifikanten Veränderungen der TGF- β Freisetzung, im Vergleich zur unstimulierten Monokultur, beobachtet werden.

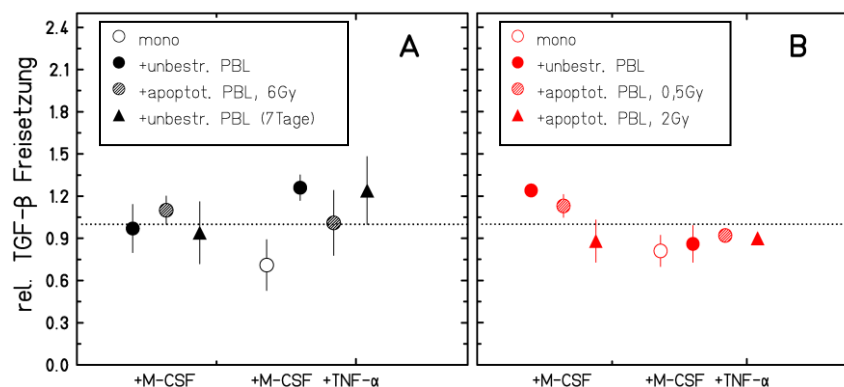


Abb. 42: Freisetzung von TGF- β in Makrophagen 20 Stunden nach Co-Inkubation mit unbestrahlten- oder apoptotischen PBL. Apoptose wurde in PBL durch Bestrahlung mit (A) 6Gy Röntgenstrahlung oder (B) 0,5 bzw. 2Gy Kohlenstoffionen (LET=60-85keV/ μ m) induziert, außerdem wurden sie ohne oder mit TNF- α [1ng/ml] stimuliert. Die Makrophagen wurden vor der Behandlung für 7 Tage kultiviert und mit M-CSF [50ng/ml] stimuliert. Ein Teil der PBL wurde gleichzeitig mit den Makrophagen isoliert und für 7 Tage kultiviert (alte PBL), der andere Teil wurde erst 24 Stunden vor der Bestrahlung frisch isoliert. Als Kontrollen wurden Monokulturen der Makrophagen mitgeführt. Die Ergebnisse für die freigesetzte Menge an TGF- β wurden auf die Kontrollwerte der unstimulierten Monokulturen normiert. (A+B: (SEM) N=2, n=4)

In Abb. 43 sind die Ergebnisse der Freisetzung von IL-10 dargestellt. In Abb. 43A sind die Daten der Röntgenexperimente abgebildet. Hierbei zeigte sich, dass durch die frisch isolierten PBL (unbestrahlt oder apoptotisch durch Bestrahlung) keine Steigerung der Freisetzung von IL-10 im Vergleich zu den Monokulturen der Makrophagen bewirkt wurde. Allein durch die unbestrahlten länger kultivierten PBL wurde eine deutliche Steigerung der Freisetzung von IL-10 um das 10fache bewirkt (in nicht mit TNF- α stimulierten Proben). Die Stimulation mit TNF- α bewirkte eine generelle Steigerung der Freisetzung von IL-10 um das 10-12fache. Im Vergleich zu LPS fiel die Steigerung jedoch deutlich niedriger aus (s. Abb. 40). Durch die Co-Kultivierung wurde in den stimulierten Proben (+TNF- α) jedoch keine signifikante Veränderung der Freisetzung von IL-10 bewirkt.

In Abb. 43B sind die Daten der Bestrahlungsexperimente mit Kohlenstoffionen abgebildet. Auch hier erfolgte die Bestrahlung der PBL mit zwei verschiedenen Dosen (0,5 und 2Gy). Allerdings konnte keine Veränderung der Freisetzung von IL-10 durch die Co-Kultivierung beobachtet werden. Einzig die Co-Kultivierung mit apoptotischen PBL, die mit 2Gy bestrahlt wurden, bewirkte eine leichte Reduktion der Freisetzung von IL-10 in den mit TNF- α stimulierten Proben.

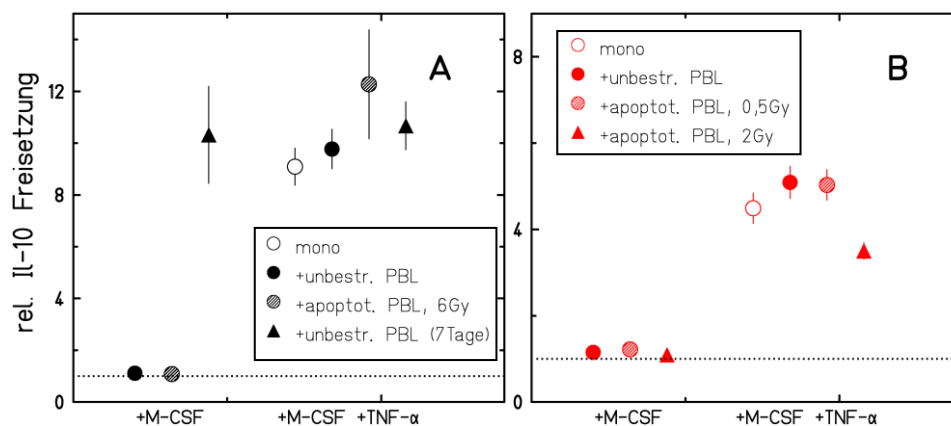


Abb. 43: Freisetzung von IL-10 in Makrophagen 20 Stunden nach Co-Inkubation mit unbestrahlten- oder apoptotischen PBL. Apoptose wurde in PBL durch Bestrahlung mit (A) 6Gy Röntgenstrahlung oder (B) 0,5 bzw. 2Gy Kohlenstoffionen (LET=60-85keV/ μ m) induziert, außerdem wurden sie ohne oder mit TNF- α [1ng/ml] stimuliert. Die Makrophagen wurden vor der Behandlung für 7 Tage kultiviert und mit M-CSF [50ng/ml] stimuliert. Ein Teil der PBL wurde gleichzeitig mit den Makrophagen isoliert und für 7 Tage kultiviert (alte PBL), der andere Teil wurde erst 24 Stunden vor der Bestrahlung frisch isoliert. Als Kontrollen wurden Monokulturen der Makrophagen mitgeführt. Die Ergebnisse für die freigesetzte Menge an IL-10 wurden auf die Kontrollwerte der unstimulierten Monokulturen normiert. (A+B: (SEM) N=2, n=4)

4.3.2.5 Zytokin-Freisetzung nach UV-B Bestrahlung

Um einen Bezug zu den bereits publizierten Daten herzustellen wurden Bestrahlungsexperimente mit UV-B Strahlung durchgeführt. Hierzu wurden frisch isolierte PBL mit 180mJ/cm² bestrahlt und nach einer 4stündigen Inkubation für 20 Stunden mit Makrophagen Co-kultiviert. Dabei wurden die Auswirkungen der Bestrahlung mit UV-B sowie mit Röntgenstrahlung im Bezug auf die Zytokin-Freisetzung miteinander verglichen. Es wurde hierbei die Freisetzung von TGF- β , TNF- α und IL-10 untersucht. Insgesamt wurden 2 Experimente mit Zellen von unterschiedlichen Spendern durchgeführt. Die Ergebnisse der Experimente sind in Abb. 44 dargestellt. Die freigesetzten Mengen pro 10⁵ Zellen der einzelnen Zytokine bewegten sich dabei in folgenden Bereichen: 130-220pg (TGF- β), 2-4pg (TNF- α), 24-220pg (IL-10). Sowohl für TGF- β als auch TNF- α waren keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Strahlungsarten zu beobachten. Außerdem wurden in Übereinstimmung mit den vorangegangenen Experimenten, durch die Co-Kultivierung keine signifikante Veränderung im Vergleich zu den Monokulturen bewirkt. Einzig für IL-10 konnte ein deutlicher Unterschied zwischen den mit Röntgenstrahlung und den mit UV-B bestrahlten PBL detektiert werden. Während durch die mit 6Gy bestrahlten PBL keine Steigerung der Freisetzung von IL-10 bewirkt wurde, verursachte die Co-Kultivierung mit UV-B bestrahlten PBL eine Steigerung der Freisetzung von IL-10 um das 6fache.

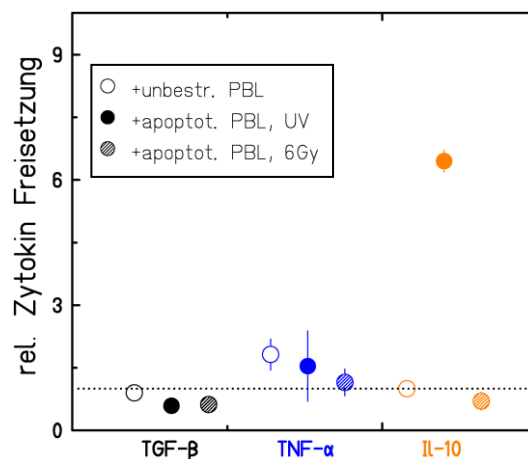


Abb. 44: Freisetzung von TGF- β , TNF- α und IL-10 in Makrophagen 20 Stunden nach Co-Inkubation mit unbestrahlten- oder apoptotischen PBL. Induktion der Apoptose durch 180mJ/cm² UV-B- oder 6Gy Röntgenstrahlung. Die Makrophagen wurden vor der Behandlung für 7 Tage kultiviert und mit M-CSF [50ng/ml] stimuliert. Die PBL wurden erst 24 Stunden vor der Bestrahlung vom gleichen Spender frisch isoliert. Als Kontrollen wurden Monokulturen der Makrophagen mitgeführt. Die Ergebnisse für die freigesetzte Menge des jeweiligen Zytokins wurden auf die Kontrollwerte der unstimulierten Monokulturen normiert. (SEM, N=2, n=4)

4.3.2.6 Zusammenfassung

In Tabelle 10 sind die Ergebnisse der einzelnen Ergebnisse bezüglich der Zytokin-Freisetzung der Co-Kulturen nochmals zusammenfassend dargestellt. Es sind hierbei die jeweiligen Veränderungen durch die Bestrahlung und/oder Stimulierung angegeben.

Tabelle 10: Zusammenfassung der Zytokin-Freisetzung nach Bestrahlung der Co-Kulturen

Subtyp	Stimulation	PBL	Alter	Veränderung		
				TGF- β	TNF- α	IL-10
unst.	unst	unbestr. apoptot [R]	7 Tage	→ →	↗ ↗	→ →
	+LPS	unbestr. apoptot [R]		↗ ↗	→ →	→ →
GM-CSF	unst	unbestr. apoptot [R]	7 Tage	→ →	→ →	→ →
	+LPS	unbestr. apoptot [R]		↗ ↗	→ →	→ →
M-CSF	unst	unbestr. PFA	7 Tage	→ NB	↗ →	→/↑ ↗
		apoptot [R]		→	↗	→/↑
		apoptot. [C-0,5]		→	→	→/↗
		apoptot. [C-2]		→	→	→
	+LPS	unbestr.	7 Tage	↗	↗	→
		apoptot [R]		↗	↗	↘
		apoptot. [C-0,5]		→	→	→
		apoptot. [C-2]		↘	→	→
	unst.	unbestr.	1 Tag	→	→	→
		apoptot [R]		→	→	→
		apoptot. [C-0,5]		→	NB	→
		apoptot. [C-2]		→	→	→
	+TNF- α	Apoptot. (UVB)		→	→	↑
		unbestr.	1 Tag	↗		→
		apoptot [R]		→	NB	↗
		apoptot. [C-0,5]		→		→
		apoptot. [C-2]		→		↘

Tab. 10: Zusammenfassung der Ergebnisse zur Zytokin-Freisetzung der Co-Kulturen von Makrophagen und unbestrahlten/apoptotischen PBL. Die PBL wurden mit Röntgenstrahlung oder Kohlenstoffionen (LET=168keV/ μ m) bestrahlt. **Symbolle:** Leichte Reduktion (↘, Faktor 0,4-3), starke Reduktion (↓, Faktor ≥ 3), keine Veränderung (→, Faktor $\leq 0,4$), leichter Anstieg (↗, Faktor 0,4-3), starker Anstieg (↑, Faktor ≥ 3) nicht bestimmt (NB).

4.4 Untersuchung von *in vivo* Effekten der Radontherapie

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mögliche direkte Effekte einer Radontherapie untersucht. Hierzu wurden 12 Patienten und 5 Personen des Personals im Heilstollen in Bad Gastein (Österreich) ausgewählt und im Abstand von 5-7 Tagen zwei Blutproben genommen. Die Probanden erhielten in diesem Zeitraum zwischen 2-5 Anwendungen (Einfahrten in den Heilstollen). Aus den Blutproben wurden zum einen die Leukozyten isoliert, um eine mögliche Induktion von Apoptose zu bestimmen und zum anderen wurde das Plasma der Probanden für eine Bestimmung des Zytokingehalts eingefroren.

4.4.1 Induktion von Apoptose in PBMC durch die Radontherapie

Zur Untersuchung von durch die Radonbehandlung induzierter Apoptose wurden ausschließlich die Proben der Patienten verwendet, da die Patienten bei der ersten Blutabnahme noch keiner Strahlung ausgesetzt waren und somit ein Vergleich zwischen unbestrahlten und bestrahlten PBMC ermöglicht wurde. Das Personal war dauerhaft einer Strahlungsbelastung ausgesetzt und litt zudem nicht unter chronisch entzündlichen Erkrankungen. Aus diesem Grund wurden diese Probanden nicht in die Auswertung eingebunden. Als Kontrollgruppe wurde die Induktion von Apoptose in 4 Probanden bestimmt, die im gleichen Zeitraum keiner Strahlungsbelastung ausgesetzt waren.

In Abb. 45 sind die Ergebnisse dargestellt. Es konnten allerdings nur Proben von 11 Patienten ausgewertet werden, da aufgrund von Messfehlern die Daten eines Patienten nicht verwendet werden konnten. Die Absolutwerte des apoptotischen Index lagen zwischen 2 und 15%. Da innerhalb der einzelnen Probanden große Abweichungen festgestellt wurden, wurde der Apoptose-Quotient aus dem Messwert vor und nach der 1wöchigen Radontherapie gebildet und über der Anzahl der Anwendungen aufgetragen. Hierbei zeigte sich eine Abhängigkeit zwischen der Anzahl der Anwendungen und der Höhe des Apoptose-Quotienten. Während die Probanden die nur zwei oder drei Anwendungen erhalten hatten, einen Quotienten von 0,3-0,8 aufwiesen, lag der Quotient für Probanden mit 5 Anwendungen in einem Bereich von 1-1,6. In der Kontrollgruppe lag der Quotient zwischen 0,7-1,6, wobei jedoch nur ein Proband einen Quotienten von 1,6 aufwies. Die anderen 3 Probanden wiesen nur einen Quotienten von 0,7-1,0 auf. Zur Überprüfung der statistischen Aussagekraft wurde der Spearman-Koeffizient berechnet. Die Berechnung ergab einen Signifikanzwert von $p \leq 0,02$.

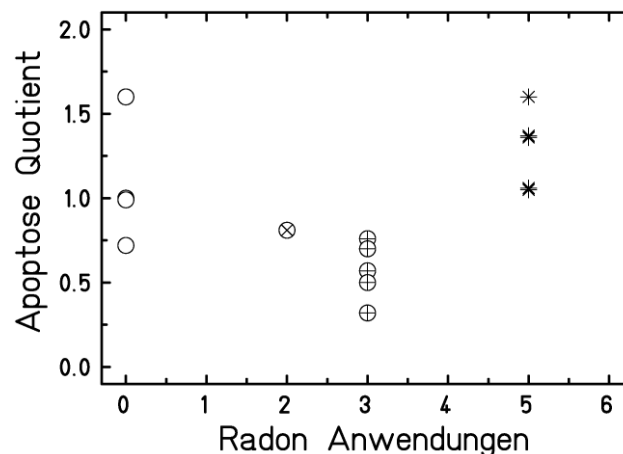


Abb. 45: Steigerung der Apoptose in PBMC durch Behandlung mit Radon. Dargestellt ist der Apoptose-Quotient in Abhängigkeit zur Anzahl der Radon-Anwendungen der einzelnen Patienten. Der Apoptose-Quotient wird gebildet aus dem apoptotischen Index vor- und nach einer 1 wöchigen Behandlungsdauer. Es wurden insgesamt 11 Patienten untersucht. ($p \leq 0,02$)

4.4.2 Zytokinkonzentration im Plasma nach Radonbehandlung

Als weiteren biologischen Endpunkt wurde die Veränderung des Zytokingehalts im Plasma von Probanden untersucht, die eine Radontherapie erhalten hatten. Hierzu wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei Experimente abgeschlossen. Das 1. Experiment wurde mit einem Morbus Bechterew Patienten durchgeführt, der eine 3wöchige Radontherapie mit 15 Anwendungen erhielt. Es wurden insgesamt drei Proben im Abstand von 1,5-2 Wochen abgenommen: vor, während und nach der Therapie. Das 2. Experiment wurde mit 5 Probanden des Heilstollenpersonals und 12 Patienten durchgeführt (siehe Kapitel 4.4). Es wurden hierbei die Konzentrationen von 4 Zytokinen bestimmt (anti-inflammatorisch: TGF- β , IL-10, M-CSF; pro-inflammatorisch: TNF- α).

4.4.2.1 TGF- β Gehalt

In Abb. 46 sind die Werte für die TGF- β Konzentration (Gesamtprotein) im Plasma abgebildet. Für Experiment 1 wurde eine leichte Steigerung der TGF- β Konzentration während der Therapie beobachtet. Allerdings fiel die Konzentration nach der Therapie sogar unter das Ausgangsniveau ab.

In Experiment 2 konnten für die Gruppe des Personals nur minimale Veränderungen der TGF- β Konzentration beobachtet werden. Die Werte lagen hierbei in einem Bereich von 4-11,5ng/ml. Einzig bei einem Probanden konnte eine Steigerung der Konzentration von 4 auf 10ng/ml beobachtet werden. Die Gruppe der Patienten wurde in drei Untergruppen unterteilt (A-C). In Gruppe A blieb die TGF- β Konzentration konstant, in Gruppe B wurde sie verringert und in Gruppe C stieg sie an. 7 Patienten lagen in Gruppe A mit einem Konzentrationsbereich von 3-6ng/ml. 1 Patient lag in Gruppe B, hier fiel die Konzentration von 22ng/ml auf die Hälfte des Wertes ab. In Gruppe C befanden sich 4 Patienten. Die Ausgangskonzentrationen lagen zwischen 11 und 15ng/ml. Am Ende der Radontherapie lagen die

TGF- β Konzentrationen in etwa um ein Drittel höher. Es konnte jedoch keine Abhängigkeit zwischen der Konzentrationsveränderung und der Anzahl der Anwendungen festgestellt werden.

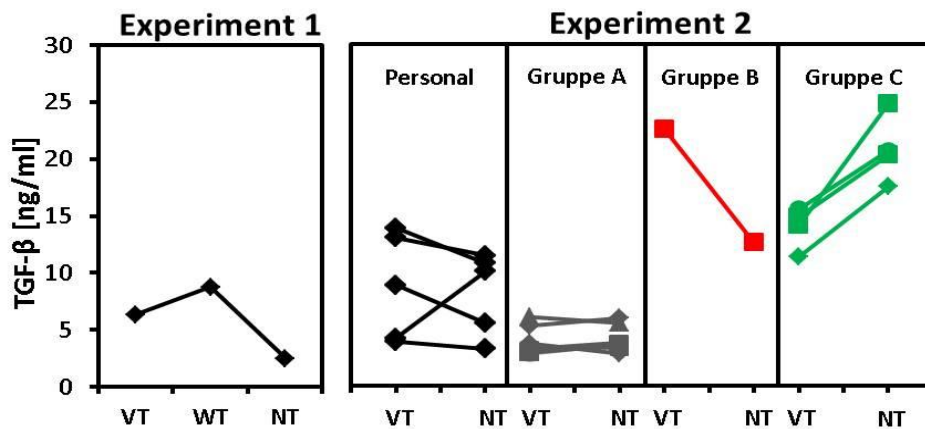


Abb. 46: TGF- β Konzentration [ng/ml] im Blutplasma von Probanden. In Experiment 1 wurden Proben von 1 Patienten genommen, vor-(VT), während-(WT) und nach-(NT) einer 3 wöchigen Kur mit insgesamt 15 Anwendungen. Experiment 2 wurde mit 5 Probanden des Stollenpersonals und 12 Patienten durchgeführt. Die Proben wurden vor- und nach einer 1 wöchigen Kur abgenommen (2-6 Anwendungen je Patient). Die Patienten wurden in 3 Gruppen eingeteilt, je nachdem ob die Konzentration gleich blieb (A), abfiel (B) oder anstieg (C).

4.4.2.2 IL-10 Gehalt

In Abb. 47 sind die Werte für die Konzentration von IL-10 im Plasma abgebildet. Hierbei wurde für Experiment 1 eine Steigerung der IL-10 Konzentration während der Therapie von 3,5pg/ml auf den dreifachen Wert beobachtet. Nach der Therapie fiel die Konzentration wieder ab, allerdings nicht bis zum Ausgangswert.

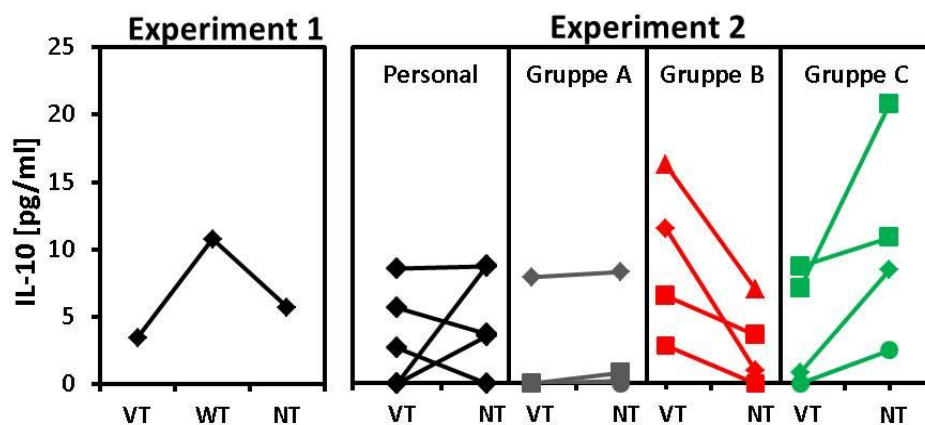


Abb. 47: IL-10 Konzentration [pg/ml] im Blutplasma von Probanden einer Radon-Kur. In Experiment 1 wurden Proben von 1 Patienten genommen, vor-(VT), während-(WT) und nach-(NT) einer 3 wöchigen Kur mit insgesamt 15 Anwendungen. Experiment 2 wurde mit 5 Probanden des Stollenpersonals und 12 Patienten durchgeführt (unterschiedliche Farben). Die Proben wurden vor- und nach einer 1 wöchigen Kur abgenommen (2-6 Anwendungen je Patient). Die Patienten wurden in 3 Gruppen eingeteilt, je nachdem ob die Konzentration gleich blieb (A), abfiel (B) oder anstieg (C).

In Experiment 2 konnten für die Gruppe des Personals keine signifikanten Veränderungen der Konzentration von IL-10 beobachtet werden. Einzig im Plasma des Probanden mit ähnlichen Ergebnissen für TGF- β wurde eine deutliche Steigerung der Konzentration von IL-10 gemessen. Die Gruppe der Patienten wurde ebenfalls in drei Untergruppen eingeteilt (A-C). In jeder Untergruppe befanden sich 4 Patienten. Gruppe A wies im Vergleich zu den anderen Gruppen die niedrigsten Konzentrationen von IL-10 auf. Die Gruppen B und C wiesen ähnliche Konzentrationsbereiche auf, die insgesamt etwas höher lagen als in Gruppe A. Auch für IL-10 konnte keine Abhängigkeit zwischen den Konzentrationsänderungen und der Anzahl der Anwendungen festgestellt werden.

4.4.2.3 M-CSF Gehalt

In Abb. 48 sind die Ergebnisse der M-CSF Konzentrationsbestimmung im Plasma abgebildet. In Experiment 1 konnte hierbei eine deutliche Steigerung der M-CSF Konzentration während der Therapie von 0 auf 173pg/ml festgestellt werden. Nach der Therapie sank die Konzentration jedoch wieder auf 10pg/ml ab.

In Experiment 2 lag die M-CSF Konzentration in den Probanden des Personals und in den meisten Patienten unterhalb der Detektionsgrenze. Nur in 3 Patienten konnten nennenswerte Mengen M-CSF detektiert werden. Hierbei kam es bei 2 Patienten zu einer Reduktion der Konzentration unterhalb der Detektionsgrenze. Bei einem Patienten kam es zu einer minimalen Erhöhung der Konzentration.

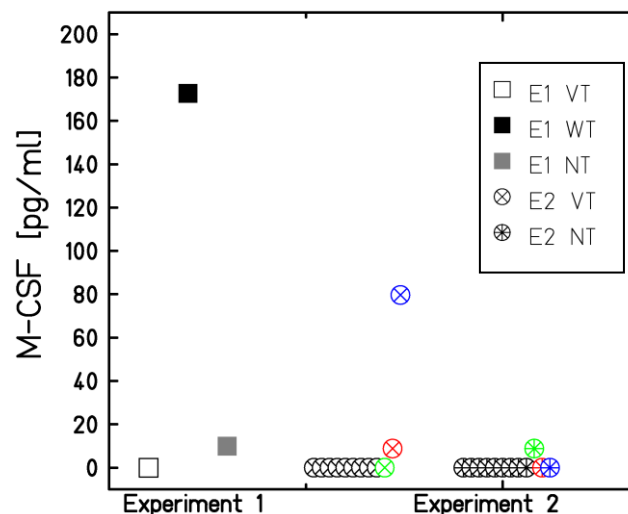


Abb. 48: M-CSF Konzentration [pg/ml] im Blutplasma von Patienten, vor- und nach einer Radonkur. In Experiment 1 (E1) wurden Proben von 1 Patienten genommen, vor-(VT), während-(WT) und nach-(NT) einer 3 wöchigen Kur mit insgesamt 15 Anwendungen. Experiment 2 (E2) wurde mit 12 Patienten durchgeführt die Proben wurden vor- und nach einer 1 wöchigen Kur abgenommen (2-6 Anwendungen je Patient).

4.4.2.4 TNF- α Gehalt

In Abb. 49 sind die Ergebnisse der TNF- α Konzentrationsbestimmung im Plasma abgebildet. In Experiment 1 konnte hierbei keine signifikante Veränderung der TNF- α Konzentration beobachtet werden. Es war nur eine geringfügige Erniedrigung der Konzentration von nach der Therapie zu beobachten. Allerdings war das Konzentrationslevel in allen 3 Proben im Vergleich zu den Proben aus Experiment 2 deutlich erhöht. In Experiment 2 lagen die TNF- α Konzentrationen bei fast allen Probanden (Personal und Patienten) unterhalb der Detektionsgrenze. Einzig je 1 Proband des Personals und der Patienten zeigten detektierbare Mengen an TNF- α . Während für den Proband des Personals keine Veränderungen der TNF- α Konzentration zu beobachten waren, konnte für den Patient ebenfalls eine leichte Erniedrigung der Konzentration beobachtet werden.

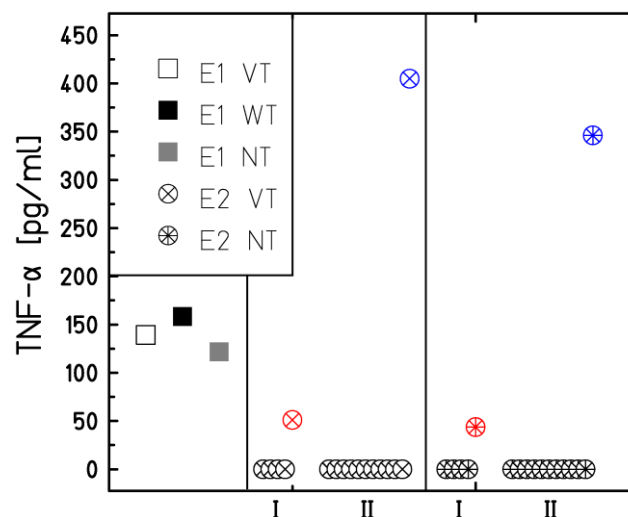


Abb. 49: TNF- α Konzentration [pg/ml] im Blutplasma von Probanden, vor- und nach einer Radon-Kur. In Experiment 1 (E1) wurden Proben von 1 Patienten genommen, vor-(VT), während-(WT) und nach-(NT) einer 3 wöchigen Kur mit insgesamt 15 Anwendungen. Experiment 2 (E2) wurde mit 5 Probanden des Stollenpersonals (I) und 12 Patienten (II) durchgeführt. Die Proben wurden vor- und nach einer 1 wöchigen Kur abgenommen (2-6 Anwendungen je Patient).

4.4.2.5 Zusammenfassung

Zusammenfassend konnten nur für TGF- β und IL-10 in fast allen Probanden nennenswerte Konzentrationen gemessen werden. Hierbei konnten jedoch keine einheitlichen Veränderungen beobachtet werden. So kam es für beide Zytokine sowohl zu Steigerungen als auch zu Reduktionen der Konzentration sowie in einigen Probanden zu keinen Veränderungen. Bezüglich M-CSF und TNF- α waren in der Mehrzahl der Probanden keine messbaren Konzentrationen detektierbar. Für M-CSF wurde nur in einem Patienten eine deutliche Steigerung der Konzentration beobachtet. Insgesamt konnte jedoch für kein Zytokin ein Zusammenhang zwischen der Veränderung der Konzentration und der Anzahl der Anwendungen hergestellt werden.

5 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, die zellulären Mechanismen, die der anti-entzündlichen Wirkung der Niedrig-Dosis-Strahlentherapie zugrunde liegen, zu untersuchen. Hierzu wurden mögliche Zielzellen ausgesucht, die mit niedrigen Dosen ionisierender Strahlung bestrahlt wurden. Zudem wurden mögliche Unterschiede zwischen dicht- und dünn-ionisierender Strahlung untersucht, da sowohl Photonen- als auch α -Strahlung in der Niedrig-Dosis-Strahlentherapie angewendet werden. Eine unterschiedliche Wirkungsweise ist wahrscheinlich, da die lokale Dosisdeposition von α -Strahlung deutlich höher ist als die von Photonenstrahlung. Zu den Besonderheiten der Wirkung von α -Strahlung liegen zum jetzigen Zeitpunkt noch keine Publikationen vor. An den Bestrahlungseinrichtungen der GSI war es möglich beschleunigte, niederenergetische Kohlenstoffionen zu verwenden, die ähnliche Eigenschaften wie α -Strahlung aufweisen und damit in ihrer Wirkung einer Radonexposition ähneln.

Basierend auf unserer Ausgangshypothese²⁹ gliedert sich die Arbeit experimentell in 4 Teile:

Der erste Teil befasst sich mit der Induktion von Apoptose in potentiellen Zielzellen der Strahlung, nämlich PBL, Makrophagen und Endothelzellen. Hierbei wurde außerdem noch ein möglicher Einfluss einer pro- oder anti-inflammatorischen Stimulierung der Zielzellen vor Bestrahlung untersucht.

Der zweite Teil der Arbeit befasste sich mit dem Adhäsionsverhalten von PBL an Endothelzellen. Es wurde hierbei zum einen ein direkter Einfluss der Bestrahlung auf die Adhäsion untersucht und zum anderen eine mögliche Beteiligung des Zytokins TGF- β an der Regulation dieses Prozesses.

Im dritte Teil wurde ein möglicher Einfluss von apoptotischen PBL auf Makrophagen untersucht. Hierzu wurden die Lymphozyten mit den Makrophagen co-kultiviert. Im Anschluss an die Co-Kultivierung wurde sowohl die Phagozytose der apoptotischen PBL durch die Makrophagen als auch die Zytokin-Freisetzung in der Co-Kultur untersucht.

Der letzte Teil der Arbeit beschäftigte sich mit ausgewählten *in vivo* Effekten der Radontherapie. Hierbei wurde im Blut von Patienten zum einen die Induktion von Apoptose in PBMC untersucht und zum anderen Konzentrationsänderungen von vier Zytokinen im Blutplasma gemessen.

²⁹ Siehe Kapitel 2.4.1

5.1 Induktion von Apoptose durch ionisierende Strahlung

Entsprechend der Annahme, dass die Induktion von Apoptose als entzündungshemmender Faktor auch bei der entzündungshemmenden Wirkung von Radonstrahlung eine Rolle spielt, wurde in dieser Arbeit die strahleninduzierte Induktion von Apoptose in drei potentiellen Zielzellen, nämlich PBL, Makrophagen und Endothelzellen untersucht. Das Hauptinteresse lag hierbei auf der Induktion von Apoptose im Niedrig-Dosis-Bereich ($\leq 1\text{Gy}$) in PBL.

In den Experimenten zur strahleninduzierten Induktion von Apoptose in PBL konnte eine signifikante, dosisabhängige Steigerung der Apoptose beobachtet werden (siehe Abb. 22). Dies galt sowohl für Röntgenstrahlung als auch für beschleunigte Ionen (Kohlenstoff und Stickstoff). Es kam bereits 24 Stunden nach Bestrahlung ab einer Dosis von $0,5\text{Gy}$ zu einer deutlichen Steigerung der Apoptose. Eine pro- oder anti-inflammatorische Stimulierung hatte jedoch keinen Einfluss auf die Einleitung der Apoptose (siehe Abb. 23). Im Vergleich von dünn- und dicht ionisierender Strahlung zeigte sich, dass durch dicht ionisierende Strahlung mehr apoptotische Zellen in der Population zu finden waren als durch dünn-ionisierende Strahlung.

Die Apoptoserate kann neben anderen biologischen Endpunkten zur Bestimmung der Strahlensensitivität eines Zelltyps herangezogen werden. Für PBL ist bereits seit längerem bekannt, dass sie sehr sensitiv auf ionisierende Strahlung reagieren. So wurde in den Arbeiten von Schmitz et al. die Induktion von Apoptose in B- und T-Lymphozyten durch γ -Strahlung untersucht [66, 67]. In beiden Arbeiten wurde eine deutliche Steigerung der Apoptose für Dosen $\geq 0,5\text{Gy}$ bereits nach 18 Stunden beschrieben. Im Vergleich der beiden PBL Subtypen zeigten die B-Lymphozyten in diesen Arbeiten die größte Steigerung der Apoptose.

In der Arbeit von Meijer et al. [60] wurde die Induktion von Apoptose durch hoch-LET Stickstoffionen ($\text{LET}=140\text{keV}/\mu\text{m}$) mit γ -Strahlung verglichen. Hierbei wurden ebenfalls deutliche, dosisabhängige Steigerungen der Apoptose beschrieben (ab Dosen $\geq 1\text{Gy}$). Der Vergleich von hoch-LET- mit γ -Strahlung bezüglich der Induktion von Apoptose ergab für die hoch-LET Strahlung RBW-Werte von $\geq 1,3$ sowie einen schneller verlaufenden Anstieg der Apoptose. Auch in den Arbeiten von Conrad und Kraft [68, 69] wurde eine dosisabhängige Steigerung der Apoptose nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung und Kohlenstoffionen ($\text{LET}=60\text{-}85\text{keV}/\mu\text{m}$) beschrieben. In beiden Arbeiten wurde ebenfalls eine höhere Apoptoserate nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen im Vergleich zur Röntgenstrahlung aufgezeigt.

Somit stehen die hier gezeigten Ergebnisse in guter Übereinstimmung zu den bereits publizierten Daten. Die hohe Strahlensensitivität der PBL führt zur Schlussfolgerung, dass auch bereits niedrige Dosen, wie sie in der Niedrig-Dosis-Strahlentherapie angewendet werden, zu einer Erhöhung der Apoptoserate führen. Die Tatsache, dass dicht-ionisierende- im Vergleich zu dünn-ionisierender

Strahlung höhere RBW-Werte für die Induktion von Apoptose aufweist, legt den Schluss nahe, dass auch *in vivo* durch Radonbestrahlung entsprechend mehr Apoptose als bei Röntgenbestrahlung mit niedrigen Dosen induziert wird. Es konnte damit eindeutig bestätigt werden, dass PBL auf niedrige Dosen direkt reagieren und somit sehr wahrscheinlich in die zellulären Mechanismen der anti-entzündlichen Effekte eingebunden sind.

5.1.1 Apoptose in Makrophagen

Neben den PBL wurde in dieser Arbeit auch die Induktion von Apoptose in humanen Makrophagen untersucht. Es konnte jedoch keine Steigerung der Apoptose durch die Bestrahlung beobachtet werden (siehe Abb. 24). Die Absolutwerte der Makrophagen lagen in einem Bereich von 1-2%.

Statt einer Steigerung war sogar eher ein Trend zu einer leichten Reduktion der Apoptoserate für höheren Dosen ($\geq 6\text{Gy}$) zu beobachten. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die Makrophagen einen Teil der entstandenen apoptotischen Zellen bereits innerhalb der Inkubationszeit phagozytiert hatten. Hierzu wurde bereits in der Arbeit von Conrad et al. beschrieben, dass die phagozytotische Aktivität von murinen Makrophagen durch höhere Dosen ionisierender Strahlung ($\geq 2\text{Gy}$) gesteigert wurde [62]. Dies konnte auch für humane Makrophagen gezeigt werden [68]. Auch in der Arbeit von Benderitter et al. konnte durch die Bestrahlung von Makrophagen mit sehr hohen Dosen γ -Strahlung (15 oder 30Gy) eine signifikante Steigerung der phagozytotischen Aktivität erreicht werden [70]. Diese Ergebnisse unterstützen somit die Hypothese, dass bei höheren Dosen eine Steigerung der phagozytotischen Aktivität von Monozyten und Makrophagen erfolgt. Hierdurch konnten mehr apoptotischen Zellen phagozytiert werden. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass es aufgrund von Bestrahlung in Makrophagen nicht zur Induktion von Apoptose kommt und deshalb im Rahmen der Niedrig-Dosis Therapie die Entstehung von apoptotischen Makrophagen keine Rolle spielt.

5.1.2 Apoptose in Endothelzellen

Es wurde im Rahmen dieser Arbeit ein möglicher Zusammenhang zwischen strahleninduzierten Veränderungen der Adhäsion von PBL an Endothelzellen und der Induktion von Apoptose in Endothelzellen untersucht. Die entsprechenden Bestrahlungsexperimente mit Röntgenstrahlung und Nickelionen wurden ausschließlich mit HUVEC durchgeführt. Für Röntgenstrahlung konnte 24 Stunden nach Bestrahlung keine Steigerung der Apoptose beobachtet werden (siehe Abb. 25). Im Gegensatz dazu wurde durch die Bestrahlung mit Nickelionen eine deutliche Steigerung der Apoptose von ca. 10% in Kontrollzellen auf ca. 25% ab einer Dosis von 2Gy bewirkt.

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen wurde in publizierten Arbeiten zu diesem Thema für Endothelzellen durchweg eine deutliche Steigerung der Apoptose durch ionisierende Strahlung beschrieben. So wurde von Langley et al. eine Steigerung der Apoptose um 20-30% *in vitro* nach Bestrahlung von Rinder-Endothelzellen mit Röntgenstrahlung beschrieben [71]. Hierbei wurden die Zellen mit 10Gy

bestrahlt. Die Messung erfolgte nach 6 bzw. 8 Stunden. Auch Nübel et al. beschreibt eine Steigerung der Apoptose um 2-10% nach Bestrahlung von HUVEC mit γ -Strahlung [72]. Die Bestrahlung erfolgte mit 2 oder 10Gy und die Inkubationszeit nach Bestrahlung betrug zwischen 48 und 96 Stunden. Es wurden auch Bestrahlungsexperiment *in vivo* zu diesem Thema veröffentlicht [73, 74]. Auch in diesen Arbeiten konnte eine deutliche Steigerung der Apoptose in Mäusen nach einer Ganzkörper-Bestrahlungen mit 12-50Gy beobachtet werden. Die Inkubationszeiten betrugen zwischen 4 und 24 Stunden.

Die Unterschiede der hier präsentierten zu den bereits publizierten Daten liegen z.T. an einem unterschiedlichen experimentellen Vorgehen (Färbemethode, Dosis, Inkubationszeit, *in vitro* vs. *in vivo*). So wurde in der Arbeit von Langley et al. die Apoptose zum einen morphologisch über die Entstehung von Micronuclei bestimmt und zum anderen über die Fragmentierung der DNA. In der Arbeit von Nübel et al. wurde zwar ebenfalls Annexin-V zur Detektion der Apoptose verwendet, allerdings wurden die Zellen nicht mikroskopisch untersucht, sondern am Durchflusszytometer gemessen. Hierzu mussten die Zellen abgelöst und suspendiert werden, was wiederum das Messergebnis beeinflussen kann. Des Weiteren könnte eine mögliche protektive Wirkung von Wachstumsfaktoren wie EGF (*endothelial growth factor*) oder FGF (*fibroblast growth factor*), die im Medium der Endothelzellen enthalten sind, die Induktion der Apoptose verhindert haben [73, 74]. In einer anderen Arbeit die am gleichen Institut durchgeführt wurde, wurde ebenfalls keine dosisabhängige Steigerung der Apoptose beobachtet [63].

Abschließend kann jedoch festgehalten werden, dass die bis jetzt publizierten Ergebnisse Strahlungseffekte nur für höhere Dosen ($\geq 10\text{Gy}$) beschreiben. Es ist daher anzunehmen, dass für niedrige Dosen keine signifikante Steigerung der Apoptose zu erwarten ist.

5.2 Adhäsion von PBL an Endothelzellen

Die Adhäsion von PBL an Endothelzellen steht zu Beginn des Prozesses der Extravasation. Er ist damit ein essentieller Schritt in der Aktivierung bzw. Regulierung der Immunantwort. In einigen Arbeiten wurde bereits eine Reduktion der Adhäsion von PBL an Endothelzellen beschrieben nachdem die Endothelzellen mit niedrigen Dosen ($\leq 1\text{Gy}$) Röntgenstrahlung bestrahlt wurden [24, 36, 75]. Die Autoren diskutieren diesen Effekt im Zusammenhang mit der Wirkung der Niedrig-Dosis Strahlentherapie. Hierbei wird davon ausgegangen, dass eine reduzierte Adhäsion von PBL auch zu einer Reduktion der Immunzellen im lokalen Gewebe führt, was wiederum einen Rückgang der Entzündung im betroffenen Gewebe bewirken könnte.

In den angeführten Arbeiten wurden keine primären humanen Endothelzellen verwendet, sondern Maus-Endothelzellen bzw. eine humane Hybrid-Endothellinie. In der vorliegenden Arbeit wurden die Experimente auf primäre humane Endothelzellen erweitert. Hierbei wurde außerdem eine mögli-

che Beteiligung von TGF- β an der strahlungsvermittelten Reduktion der Adhäsion untersucht. Weitere Untersuchungsfelder lagen im Vergleich von dicht- und dünn-ionisierender Strahlung sowie in der Auswirkung einer dynamischen Kultivierung auf die Adhäsion.

5.2.1 Reduktion der PBL-Adhäsion an Endothelzellen durch ionisierende Strahlung

Zur Untersuchung der Reduktion der Adhäsion durch Röntgenstrahlung oder beschleunigte Ionen wurden drei verschiedene primäre Endothelzellen verwendet (HUVEC, HPAEC, HMVEC). Zum Vergleich mit bereits veröffentlichten Arbeiten wurden ebenfalls Experimente mit einer Hybrid-Endothelzelllinie aus HUVEC und der Lungen-Tumorzelllinie A549 (EA.hy.926) durchgeführt. Zu Beginn der experimentellen Arbeiten wurde erfolgreich eine verbesserte Detektionsmethode etabliert, die eine schnellere Auswertung ermöglichte und zudem die statistische Basis erhöhte. Hierbei wurde die frühere Methode, die auf einer mikroskopischen Auswertung basierte durch eine durchflusszytometrische Detektion und Auswertung ersetzt. Des Weiteren wurde im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich ein System entwickelt, um die Veränderung der Adhäsion durch ionisierende Strahlung unter dynamischen Kultivierungsbedingungen zu untersuchen.

5.2.1.1 EA.hy.926

Die Ergebnisse für EA.hy.926 Zellen decken sich mit bereits publizierten Daten von Rödel et al. [24, 36]. Durch eine Bestrahlung mit 0,5Gy wurde die Adhäsion der PBL um 30% im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrollen reduziert (siehe Tabelle 4). Die Bestrahlung mit einer hohen Dosis bewirkte hingegen keinerlei Veränderung der Adhäsion. Rödel et al. kommen in ihren Arbeiten bezüglich der unterschiedlichen Wirkung von hohen und niedrigen Dosen zu den gleichen Ergebnissen. Hierbei wurde eine Reduktion der Adhäsion um 50% nach Bestrahlung mit 0,5Gy Röntgenstrahlung beschrieben. Auch in der Arbeit von Kern et al. wird die Reduktion der Adhäsion für Dosen zwischen 0,1 und 0,7Gy sowie für Dosen ≥ 10 Gy beschrieben [75].

In den hier präsentierten Bestrahlungsexperimenten, die mit Kohlenstoffionen durchgeführt wurden, konnte keine Reduktion der Adhäsion beobachtet werden (siehe Abb. 26). Es liegen für diese Zelllinie bis jetzt keine vergleichbaren Daten vor, so dass an dieser Stelle kein Vergleich angestellt werden kann. Die erzielten Ergebnisse zeigen jedoch deutlich, dass es sich bei den Bestrahlungseffekten explizit um einen Niedrig-Dosis-Effekt handelt. Da die lokal applizierte Dosis nach einer Bestrahlung mit Kohlenstoffionen deutlich höher ist als nach einer Bestrahlung mit Photonen, bestätigt dies die Annahme, dass dieser Effekt in EA.hy.926 nur im Niedrig-Dosis-Bereich auftritt.

Da es sich bei EA.hy.926 jedoch um keine primären Zellen handelt, ist die Übertragbarkeit der hier gezeigten Ergebnisse auf die *in vivo* Situation jedoch stark eingeschränkt. Zumal die Zelllinie aus der Fusion von Primärzellen und einer Tumorzelle hervorgegangen ist. Die Eigenschaften bezüglich der

Adhäsion könnten daher auch auf die Fähigkeit der Tumorzellen zur Adhäsion an Blutgefäßwände im Rahmen von Migration und Metastasierung zurückgehen.

5.2.1.2 HUVEC und HPAEC

Für die primären Endothelzelltypen HUVEC und HPAEC konnte in keinem Experiment eine Veränderung der Adhäsion durch Bestrahlung festgestellt werden (siehe Tabelle 4). Dies war für alle applizierten Dosen (0,5-6Gy) sowohl für Röntgenstrahlung, als auch für beschleunigte Ionen (Kohlenstoff und Stickstoff) der Fall.

Die Ergebnisse bezüglich der Adhäsion von PBL an HUVEC nach Bestrahlung sind in guter Übereinstimmung mit publizierten Ergebnissen von Colden-Stanfield et al. [76]. Dort konnte ebenfalls keine Veränderung der Adhäsion durch γ -Strahlung beobachtet werden. Hierbei wurden Dosen von 1-10Gy appliziert. Die Inkubationszeiten betrugen 4-72 Stunden. Allerdings wurden in dieser Arbeit keine primären PBL, sondern HL-60 Zellen verwendet, bei denen es sich um myeloide Tumorzellen handelt.

Es existieren aktuell noch keine Arbeiten, die sich mit der Wirkung von beschleunigten Ionen auf die Adhäsion in HUVEC befassen. Für HPAEC existieren bis jetzt noch überhaupt keine Arbeiten zu einer strahleninduzierten Veränderung der Adhäsion.

Um auszuschließen, dass sich Veränderungen der Adhäsion in einem anderen zeitlichen Rahmen nach Bestrahlung abspielen, wurden mit HUVEC Adhäsionsexperimente nach längeren Inkubationszeiten (5-8 Tage) durchgeführt (siehe Abb. 27). Hierbei wurden ebenfalls keine Veränderungen der Adhäsion beobachtet. Einzig nach 8 Tagen war eine leichte Steigerung der Adhäsion nach einer Bestrahlung mit 6Gy zu beobachten. Dieser leichte Anstieg stimmt mit den Beobachtungen von Gaugler et al. insoweit überein, dass dort ebenfalls ein Anstieg der Expression von Adhäsionsmolekülen nach einer Bestrahlung mit 10Gy im gleichen Zeitraum beschrieben wird [64].

Für HUVEC wurde bereits in mehreren Publikationen eine Steigerung der Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 oder E-Selektin nach Bestrahlung mit hohen Dosen (≥ 7 Gy) Röntgen- oder γ -Strahlung beschrieben [77–79]. Parallel zur vorliegenden Arbeit wurden in der gleichen Arbeitsgruppe Experimente zur Expression von Adhäsionsmolekülen durchgeführt.³⁰ Hierbei konnte aber ebenfalls keine Verringerung der Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen durch Bestrahlung beobachtet werden. In Übereinstimmung zu den Ergebnissen von Gaugler et al. wurde nur eine Steigerung der Expression nach Bestrahlung mit hohen Dosen beobachtet. In den Untersuchungen wurden die gleichen Endothelzellen verwendet, wie in den hier beschriebenen Experimenten (EA.hy.926, HUVEC, HPAEC, HMVEC).

³⁰ Im Rahmen einer Doktorarbeit von Till Dettmering. (noch nicht publiziert)

Abschließend kann festgehalten werden, dass durch Bestrahlung mit hohen oder niedrigen Dosen in beiden Zelltypen keine Veränderung der Adhäsion hervorgerufen wird. Eine Steigerung von Adhäsionsmolekülen wurde zudem nur nach Bestrahlung mit hohen Dosen beschrieben. Hierdurch werden die Ergebnisse für EA.hy.926 stark relativiert, da diese Zelllinie aus der Fusion von HUVEC mit einer Tumorzelllinie hervorgegangen ist. Es muss daher in Betracht gezogen werden, dass die Eigenschaften von EA.hy.926 bezüglich der Adhäsion ursprünglich von der Tumorzelllinie stammen und damit aus den Ergebnissen kein direkter Rückschluss auf primäre Endothelzellen gezogen werden kann.

5.2.1.3 HMVEC

Endothelzellen aus den mikrovaskulären Gefäßen (HMVEC) sind die einzigen untersuchten primären Endothelzellen, die auf Bestrahlung mit einer Veränderung der Adhäsion reagierten. Hierbei war sowohl für niedrige als auch für hohe Dosen eine Reduktion der Adhäsion zu beobachten (siehe Tabelle 4). Die Reduktion fiel nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung etwas deutlicher aus als nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen. Da der Unterschied zwischen beiden Strahlenarten jedoch sehr gering war, kann an dieser Stelle nur von einem Trend gesprochen werden.

Für mikrovaskuläre Endothelzellen liegt bis jetzt nur eine Arbeit zu strahleninduzierten Veränderungen der Adhäsion von PBL vor. Zur Wirkung von beschleunigten Ionen wurden bis jetzt noch überhaupt keine Arbeiten veröffentlicht.

So wurde in der Arbeit von Vereycken-Holler et al. die Veränderung der Adhäsion in mikrovaskulären Endothelzellen der Lunge nach Bestrahlung mit 10Gy γ -Strahlung untersucht [80]. In dieser Publikation wurden die Adhäsionsexperimente unter dynamischen Bedingungen durchgeführt. Die Autoren kamen hierbei zu dem Ergebnis, dass durch die Bestrahlung eine Steigerung der Adhäsion verursacht wurde. Der entscheidende Unterschied zu den hier präsentierten Ergebnissen ist jedoch, dass in der Arbeit von Vereycken-Holler et al. keine Stimulierung mit TNF- α erfolgte und der Bezugswert unstimulierte und unbestrahlte Zellen sind. Ein übereinstimmender Trend zeigt sich auch in den Ergebnissen dieser Arbeit, wobei ein Datensatz ebenfalls einen Vergleich von unstimulierten Kontrollzellen mit unstimulierten bestrahlten Zellen erlaubt (siehe Tabelle 4).

Indirekte Hinweise zum Adhäsionsverhalten ergeben sich auch aus einer Arbeit, in der für mikrovaskuläre Endothelzellen aus der Vorhaut die Steigerung der Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung (5 und 10Gy) untersucht wurde [81]. Hierbei wurde bereits 24 Stunden nach Bestrahlung eine dosisabhängige Steigerung der Expression von allen drei Adhäsionsmolekülen beobachtet. Die Steigerung von ICAM-1 in mikrovaskulären Gefäßen durch Bestrahlung konnte auch *in vivo* bestätigt werden [82]. Allerdings wurden die Endothelzellen in den Arbeiten von Heckmann et al. und Hallahan et al. nicht mit TNF- α stimuliert, so dass ein Vergleich mit den hier präsentierten Daten nur bedingt möglich ist. Es konnte jedoch eben-

falls in parallel zur hier präsentierten Arbeit durchgeführten Experimenten in der gleichen Arbeitsgruppe eine Steigerung der Adhäsionsmoleküle 3-5 Tage nach Bestrahlung beobachtet werden.³¹ In diesen Experimenten wurden die Endothelzellen analog zu den hier gezeigten Experimenten ebenfalls mit TNF- α stimuliert. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die Reduktion der Adhäsion unabhängig von der Expression der Adhäsionsmoleküle erfolgt.

Im Gegensatz zu den bereits publizierten Experimenten, in denen ausschließlich eine Steigerung der Adhäsion nach höheren Dosen (≥ 10 Gy) beobachtet wurde, wurde in der vorliegenden Arbeit für TNF- α stimulierte Zellen für den untersuchten Dosisbereich eine entgegengesetzte Wirkung beobachtet. Die Tatsache, dass in HMVEC eine Reduktion der Adhäsion auch für höhere Dosen eintrat, weist darauf hin, dass es sich hierbei nicht um einen Niedrig-Dosis-Effekt handelt. Allerdings können mit den hier durchgeführten Zell-Experimenten komplexere Effekte innerhalb eines Gewebes nicht nachgestellt werden, die eventuell auch eine Reduktion adhäsionsfördernder Moleküle zur Folge haben können. In zeitgleich zu dieser Arbeit im gleichen Labor durchgeführten Experimenten wurde jedoch keine Reduktion der genannten Adhäsionsmoleküle nach Bestrahlung beobachtet. Allerdings sind neben den membrangebundenen Adhäsionsmolekülen auch andere Proteine an diesem Prozess beteiligt, wie das Chemokin IL-8, deren Freisetzung möglicherweise durch die Bestrahlung inhibiert wird [83]. Eine Untersuchung zur Rolle weiterer Faktoren war allerdings im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

5.2.1.4 Veränderung der Adhäsion durch Bestrahlung unter dynamischen Bedingungen

Die Etablierung eines Systems zur Untersuchung des Adhäsionsverhaltens von PBL an Endothelzellen unter dynamischen Bedingungen wurde im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich abgeschlossen. Es konnte hierbei für mikrovaskuläre Endothelzellen (HMVEC) gezeigt werden, dass die Bestrahlung mit 0,5Gy ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der Adhäsion von PBL führte (siehe Abb. 28). Die Reduktion fiel dabei weitaus deutlicher aus, als dies für die Experimente unter statischen Bedingungen beobachtet wurde. Eine Bestrahlung mit 6Gy bewirkte zwar ebenfalls eine deutliche Reduktion der Adhäsion, diese fiel jedoch geringer aus als nach der Bestrahlung mit 0,5Gy.

Vergleichbare Arbeiten deren Experimente unter dynamischen Bedingungen durchgeführt wurden, wurden von Vereycken-Holler et al. und Arenas et al. veröffentlicht [49, 80]. Da in der bereits erwähnten Studie von Vereycken-Holler andere Kultivierungsbedingungen und Dosen verwendet wurden, ist ein Vergleich nur bedingt möglich. Ob die Beobachtung der Adhäsionsreduktion nach Bestrahlung mit 6Gy im Widerspruch zu der beobachteten Steigerung nach Bestrahlung mit 10Gy bei Vereycken-Holler et al. steht, kann daher an dieser Stelle nicht beantwortet werden. Hierzu müssten weitere Versuche unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführt werden.

³¹ Bachelorarbeit von Anna-Sophia Bothe [50]
Seite | 93

In der Arbeit von Arenas et al. wurde eine verminderte Adhäsion von murinen Leukozyten *in vivo* an Endothelzellen beschrieben. Hierbei wurden die Mäuse, vor einer Bestrahlung mit niedrigen Dosen (0,1-0,6Gy) mit LPS stimuliert. Die Detektion der Adhäsion von Leukozyten an die Gefäßwand erfolgte hierbei mittels Intravitalmikroskopie. Die Bestrahlung bewirkte eine deutliche Reduktion der Adhäsion an die Endothelzellen. Diese Ergebnisse stehen damit in guter Übereinstimmung zu den hier gezeigten Daten.

Abschließend kann festgehalten werden, dass die Ergebnisse zum Adhäsionsverhalten unter dynamischen Bedingungen die Ergebnisse unter statischen Bedingungen in zufriedenstellender Weise bestätigen. Die Beobachtung, dass der Bestrahlungseffekt unter dynamischen Bedingungen weitaus stärker ausfällt, unterstützt die Annahme, dass dieser Effekt auch *in vivo* an der entzündungshemmenden Wirkung von Niedrigdosis-Bestrahlung beteiligt ist.

5.2.2 Einfluss von TGF- β auf die Adhäsion

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Rolle des Zytokins TGF- β bei strahleninduzierten Veränderungen des Adhäsionsverhaltens näher beleuchtet werden. Deshalb wurden die Auswirkungen sowohl einer Stimulierung der Endothelzellen mit TGF- β als auch einer Immunneutralisierung von TGF- β auf primäre Endothelzellen untersucht. Eine mögliche Beteiligung von TGF- β an der strahlungsvermittelten Reduktion der Adhäsion wird anhand von *in vitro* Experimenten in der Hybridzelllinie Ea.hy.926 diskutiert [24]. Auch in der Arbeit von Arenas et al. konnte eine Beteiligung von TGF- β an der Regulation der Adhäsion nachgewiesen werden [49].

5.2.2.1 TGF- β Stimulierung

Die Experimente zur Stimulierung mit TGF- β wurden mit allen vier Endothelzellen durchgeführt. Dabei wurden mögliche Unterschiede zwischen einer Stimulierung mit TGF- β alleine und einer Stimulierung mit TGF- β und TNF- α untersucht. Es konnte hierbei in keinem Zelltyp eine TGF- β vermittelte Reduktion der Adhäsion beobachtet werden (siehe Tabelle 5). Durch die Stimulierung mit TGF- β alleine wurde in HUVEC und HMVEC sogar eine leichte Erhöhung der Adhäsion im Vergleich zu den unstimulierten Proben bewirkt.

Die präsentierten Ergebnisse zur Stimulierung mit TGF- β stehen im Widerspruch zu Experimenten von Gamble et al. [84]. Hierbei wurden HUVEC ebenfalls mit TGF- β stimuliert (2ng/ml). Nach 6-24 Stunden wurde dann die Adhäsion von PBL gemessen. Es wurde eine teilweise Inhibition der Adhäsion durch TGF- β beobachtet. Die Differenzen zwischen den hier präsentierten Daten und denen von Gamble et al. können wahrscheinlich auf ein unterschiedliches experimentelles Design zurückgeführt werden. So wurden die Endothelzellen im Gegensatz zu den hiergezeigten Experimenten zunächst für 24 Stunden nur mit TGF- β stimuliert und erst dann für 6 Stunden mit TNF- α . In den hier beschriebenen Experimenten erfolgte die Stimulierung mit TGF- β und TNF- α simultan für 24 Stunden. Die

Durchführung von Experimenten unter vergleichbaren Bedingungen war allerdings im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich.

Indirekt werden die hier präsentierten Ergebnisse durch die Publikation von Suzuki et al. unterstützt [85]. In dieser Arbeit wurde nicht direkt die Adhäsion untersucht, sondern die Expression von Adhäsionsmolekülen. Hierbei konnte eine leichte Steigerung der ICAM-1 Expression in HUVEC, 2-24 Stunden nach Stimulierung mit TGF- β (1ng/ml) beobachtet werden. Außerdem wurde von Suzuki et al. *in vivo* eine Steigerung der Einwanderung von Neutrophilen ins Lungengewebe von Meerschweinchen beschrieben, die mit 25 μ g TGF- β (*iv*) behandelt wurden. In der Arbeit von Kiyohara et al. wurde ebenfalls eine leichte Steigerung der ICAM-1 Expression nach einer Stimulierung von HUVEC mit TGF- β (10ng/ml) für 24 Stunden beschrieben [86].

5.2.2.2 Immunneutralisierung von TGF- β

Die Experimente zur Neutralisierung von TGF- β wurden ausschließlich mit HMVEC durchgeführt, da dies die einzigen primären Endothelzellen waren, bei denen eine Reduktion der Adhäsion nach Bestrahlung zu beobachten war. Hierbei zeigte sich, dass durch die Neutralisierung von TGF- β der Bestrahlungseffekt aufgehoben werden konnte (siehe Tabelle 6). Der Effekt der Neutralisierung trat sowohl nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung als auch nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen auf.

Die Ergebnisse zur TGF- β Neutralisierung befinden sich in guter Übereinstimmung zu anderen Arbeiten [24, 36], in denen EA.hy.926 Zellen verwendet wurden. Auch hier wurde die Aufhebung des Bestrahlungseffekts durch Neutralisierung von TGF- β beobachtet. Im Rahmen der gleichen Studien wurde gezeigt, dass die Freisetzung des Chemokins CCL20 durch eine Co-Inkubation von EA.hy.926 und PBL gesteigert wird. CCL20 hat hierbei als Chemokin die Funktion einen chemotaktischen Gradienten für Leukozyten aufzubauen und wirkt somit adhäsionsfördernd [36]. Durch eine Bestrahlung mit 0,8 Gy wurde die Freisetzung von CCL20 dann aber deutlich reduziert. Eine Neutralisierung von TGF- β hob diesen Strahlungseffekt jedoch wieder auf.

Eine interessante Erweiterung dieser Erkenntnisse ergibt sich durch eine Arbeit, in der nicht der Effekt von Bestrahlung, sondern die Auswirkung einer Inhibition von TGF- β und IL-6 auf die Adhäsion von PBL untersucht wurde. Dazu wurden dermale oder synoviale Fibroblasten mit HUVEC co-kultiviert [87]. Hierbei wurden die Mono- oder Co-Kulturen von HUVEC und/oder Fibroblasten analog zu den hier beschriebenen Experimenten mittels einer TNF- α Stimulierung aktiviert, um so die Adhäsion der PBL zu steigern. In den Experimenten konnte gezeigt werden, dass es durch die Co-Kultivierung von HUVEC mit dermalen Fibroblasten zu einer Reduktion der Adhäsion von PBL im Vergleich zur Monokultur kam. Dieser Effekt konnte durch die Neutralisierung von IL-6 und TGF- β vollständig aufgehoben werden. Eine Inhibition von IL-6 alleine bewirkte hingegen nur eine teilweise

Aufhebung des Effekts. Auch eine direkte Stimulierung der aktivierten Monokultur (HUVEC) mit IL-6 (1 und 10ng/ml) bewirkte eine Reduktion der Adhäsion.

5.2.2.3 Fazit

In der vorliegenden Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass durch Zugabe von TGF- β keine Reduktion der Adhäsion bewirkt werden konnte. Durch die Neutralisierung von aktivem TGF- β wurden die Strahlungseffekte jedoch aufgehoben. Dies zeigt deutlich, dass TGF- β an der Regulierung der Adhäsion beteiligt ist. Es deutet jedoch viel auf ein komplexeres Zusammenwirken von mehreren Molekülen hin, die an dem Prozess der Regulierung der Adhäsion/Extravasation beteiligt sind. In Frage kämen hierfür IL-6, IL-8, CCL20 oder CXCR3. Außerdem deuten die Effekte der Neutralisierung auf eine autokrine Stimulierung der Endothelzellen nach Bestrahlung hin. Dies würde auch den Umstand erklären, dass eine externe Stimulierung mit einer relativ hohen Konzentration von aktivem TGF- β keine Auswirkung auf die Adhäsion hatte.

5.2.3 Zytokin-Freisetzung durch Endothelzellen

Um die Hypothese einer autokrinen Stimulierung der Endothelzellen zu überprüfen, wurde die Freisetzung von TGF- β , TNF- α , IL-10 und NO in allen vier Endothelzelltypen untersucht. Es zeigte sich, dass Endothelzellen weder TNF- α , noch IL-10 oder NO freisetzen. Es konnte ebenfalls für keinen Zelltyp aktives TGF- β nach Bestrahlung detektiert werden. Allerdings wurde in zeitgleich durchgeführten Experimenten im gleichen Labor eine TGF- β vermittelte, intrazelluläre Signaltransduktion in HUVEC und HMVEC nach Bestrahlung beobachtet.³²

Für HMVEC und HPAEC waren keine Veränderungen der Gesamtmenge an freigesetztem TGF- β nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung oder Kohlenstoffionen zu beobachten. Für HUVEC und EA.hy.926 waren zumindest moderate Steigerungen der TGF- β Freisetzung detektierbar. EA.hy.926 Zellen reagierten erst nach höheren Dosen mit einer signifikanten Steigerung der TGF- β Freisetzung. HUVEC reagierte hingegen auch bereits bei niedrigen Dosen mit einer Steigerung. (siehe Abb. 29)

Bezüglich der TGF- β Freisetzung von primären Endothelzellen nach Bestrahlung wurden bis jetzt noch keine Arbeiten veröffentlicht. Es ist jedoch bekannt, dass TGF- β konstitutiv in primären Endothelzellen wie HUVEC und HIMEC (*human intestinal microvasvular endothelial cells*) exprimiert wird [88, 89]. Auch die kontinuierliche Freisetzung von TGF- β durch HUVEC und Rinder Endothelzellen wurde bereits beschrieben [90].

Einzig für EA.hy.926 wurden Ergebnisse zur TGF- β Freisetzung nach Bestrahlung publiziert [24]. Die TGF- β Freisetzung wurde hierbei in einem Zeitraum von 0-40 Stunden nach Bestrahlung mit Röntgen-

³² Diplomarbeit von Aljona Groo [65]

strahlung (0,3-1Gy) gemessen. Die Zellen wurden zusätzlich vor der Bestrahlung mit TNF- α behandelt. Es konnte in den Experimenten ein deutlicher Anstieg der TGF- β Freisetzung sowohl nach 4 Stunden als auch nach 24-30 Stunden beobachtet werden.

Abschließend kann festgehalten werden, dass durch die Bestrahlung von Endothelzellen nur moderate Veränderungen der TGF- β Freisetzung bewirkt werden und durch die Bestrahlung keine im Zellkulturüberstand messbare Aktivierung von TGF- β erfolgte. Aus den hier präsentierten Ergebnissen kann daher leider kein abschließendes Urteil zur autokrinen Stimulierung der Endothelzellen abgeleitet werden. Die Beobachtungen, dass nach Bestrahlung zwar eine TGF- β vermittelte Signalweiterleitung in den Endothelzellen beobachtet werden kann, aber keine Freisetzung von TGF- β erfolgt, sowie dass die Neutralisierung von TGF- β eine Veränderung der Adhäsion bewirkt, lässt darauf schließen, dass mindestens noch ein weiterer Faktor essentiell an strahleninduzierten Veränderungen der Adhäsion beteiligt ist. Die prominente Rolle von TGF- β wie sie in der Literatur beschrieben wird muss daher kritisch hinterfragt werden.

5.3 Phagozytose von PBL durch Makrophagen

Ein wichtiger Auslöser von Entzündungshemmung und Immunsuppression allgemein ist das Auftreten von Apoptose. Dabei wird davon ausgegangen, dass die Phagozytose von apoptotischen Zellen durch Makrophagen eine anti-inflammatorische Reaktion auslöst [37, 52]. Im Zusammenhang mit der Fragestellung wurde dieser Prozess in der vorliegenden Arbeit eingehend untersucht. Während in den bereits publizierten Studien die Induktion der Apoptose ausschließlich mit UV-Strahlung oder chemischen Agenzien bewirkt wurde, stand in der vorliegenden Arbeit der Aspekt der entzündungshemmenden Wirkung der Bestrahlung mit niedrigen Dosen von ionisierender Strahlung im Vordergrund. Hierzu wurden drei verschiedene Makrophagen Subtypen mit apoptotischen PBL co-kultiviert. Im Anschluss wurde zum einen die phagozytotische Aktivität der Makrophagen und zum anderen die Freisetzung der Zytokine TNF- α , TGF- β , und IL-10 gemessen.

5.3.1 Phagozytotische Aktivität von Makrophagen nach Co-Kultivierung mit PBL

In den zu Beginn durchgeführten Experimenten zur phagozytotischen Aktivität wurden die Makrophagen mit den PBL für 20 Stunden co-kultiviert. In diesen Versuchen waren die PBL im Vorfeld der Co-Kultivierung bereits für sieben Tage kultiviert worden.³³ Dies führte dazu, dass die Unterschiede zwischen den unbestrahlten und apoptotischen PBL nicht sehr ausgeprägt waren (siehe Abb. 30). Allerdings zeigten sich deutliche Unterschiede bei den einzelnen Subtypen bezüglich der phagozytotischen Aktivität. Die spontan ausdifferenzierten Makrophagen wiesen die höchste phagozytotische Aktivität auf, diese war jedoch völlig unabhängig von der vorangegangenen Bestrahlung der PBL. Der

³³ Siehe Kapitel 4.3.2.2 und 4.3.2.3
Seite | 97

M-CSF Subtyp wies im Vergleich zu den spontan ausdifferenzierten Makrophagen eine niedrigere phagozytotische Aktivität auf. Die Co-Inkubation mit apoptotischen PBL bewirkte in diesem Subtyp jedoch eine signifikante Steigerung der phagozytotischen Aktivität. Die niedrigste phagozytotische Aktivität wies der GM-CSF Subtyp auf. Die Co-Inkubation bewirkte zwar ebenfalls eine Steigerung der phagozytotischen Aktivität, allerdings wurde dabei nicht das Niveau der anderen beiden Subtypen erreicht. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen von Xu et al. [91], die ebenfalls eine höhere phagozytotische Aktivität des M-CSF- im Vergleich zum GM-CSF Subtyp beobachtet haben.

Um das Problem der offensichtlich auftretenden spontanen Apoptose oder anderer Veränderungen in PBL nach 7 Tagen Kultivierungszeit zu umgehen, wurden die PBL im Vorfeld der nächsten Experimente nur für einen Tag in Kultur gehalten. Außerdem wurde die Co-Inkubationszeit von Makrophagen und PBL auf zwei Stunden verkürzt. Hierbei zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen der phagozytotischen-Aktivität in Gegenwart von unbestrahlten- und apoptotischen PBL (siehe Abb. 31). Dies lässt darauf schließen, dass es in den 20 Stunden zu einem Sättigungseffekt der Phagozytose-Kapazität der Makrophagen kam, so dass kaum noch weitere apoptotische PBL inkorporiert werden konnten. Hierdurch wurde dann der Unterschied zwischen den unbestrahlten- und den apoptotischen PBL teilweise nivelliert.

Des Weiteren konnte eine deutliche Abhängigkeit der phagozytotischen Aktivität von der Bestrahlungsdosis der PBL festgestellt werden. Je höher die Bestrahlungsdosis der PBL war, desto deutlicher war auch die phagozytotische Aktivität.

Es wurden bis heute nur wenige Arbeiten zum Thema Phagozytose von apoptotischen Zellen publiziert, in denen zur Generierung der apoptotischen Zellen ionisierende Strahlung verwendet wurde. In der Arbeit von Benderitter et al. wurden PBL mit γ -Strahlung (1 und 2Gy) bestrahlt und anschließend mit Makrophagen (GM-CSF Subtyp) für 48 Stunden co-kultiviert [70]. Hierbei wurde in den PBL nach 48 Stunden eine Apoptoserate von ca. 30% gemessen. Des Weiteren wurden die Makrophagen zusätzlich mit 15 oder 30Gy bestrahlt. Es konnte hierbei in allen Experimenten eine dosisabhängige Steigerung der phagozytotischen Aktivität sowohl durch Bestrahlung der PBL als auch durch Bestrahlung der Makrophagen beobachtet werden.

In der Arbeit von Saijo et al. wurden Thymozyten mit 12Gy Röntgenstrahlung bestrahlt und dann für 30Min. mit peritonealen Makrophagen co-kultiviert. Es wurde in dieser Studie allerdings nur ein Vergleich zwischen der phagozytotischen-Aktivität in Gegenwart von früh- und spät-apoptotischen Thymozyten und nicht im Vergleich zu unbestrahlten Thymozyten durchgeführt [92]. Es konnte jedoch kein Unterschied zwischen der Phagozytose von früh- und spät-apoptotischen Zellen festgestellt werden.

Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Ergebnisse zeigen deutlich, dass die durch ionisierende Strahlung erzeugte Apoptose in PBL die phagozytotische Aktivität von Makrophagen steigert. Da dies auch für niedrige Dosen von Kohlenstoffionen festgestellt wurde (siehe Abb. 31), steht dies im Einklang mit der Hypothese, dass durch die Niedrig-Dosis-Strahlentherapie Apoptose in PBL induziert werden kann und dass diese PBL dann durch Makrophagen phagozytiert werden. Die beobachtete hohe Phagozytose-Aktivität des M-CSF Subtyps deutet außerdem darauf hin, dass spezialisierte Makrophagen für die Beseitigung von apoptotischen Zellen in einem Organismus verantwortlich sind, andere eher auf die Phagozytose von eindringenden Erregern [91]. Diese Subtypen könnten dann auch für die Freisetzung immunsuppressiver Zytokine verantwortlich sein. Aus den Ergebnissen bezüglich der Phagozytose von apoptotischen Zellen können jedoch keine Rückschlüsse auf mögliche entzündungshemmende Effekte gezogen werden. Hierzu wurde in den nachfolgenden Experimenten die Zytokin-Freisetzung der Co-Kulturen untersucht.

5.3.2 Zytokin-Freisetzung in Monokulturen von Monozyten, Makrophagen und PBL

Es wurde zunächst eine mögliche direkte Wirkung von Niedrig-Dosis-Bestrahlung auf Immunzellen überprüft. Hierzu wurde die Zytokin-Freisetzung am Beispiel von TNF- α , TGF- β und IL-10 durch Monozyten, Makrophagen und PBL nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung oder beschleunigten Ionen untersucht.

5.3.2.1 TNF- α

Bezüglich der TNF- α Freisetzung von Monozyten, Makrophagen und PBL bewirkte eine Stimulierung mit LPS in allen Zelltypen eine deutliche Steigerung der TNF- α Freisetzung, während in unstimulierten Monozyten und PBL keine TNF- α Freisetzung messbar war. Allerdings wurden keine signifikanten Veränderungen nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung beobachtet (siehe Abb. 32B, Abb. 34, Abb. 36). Dies gilt bei Monozyten und Makrophagen auch für eine Bestrahlung mit Kohlenstoffionen. Nur in PBL wurde in einem Experiment mit Stickstoffionen für Dosen ≥ 2 Gy ein deutlicher Anstieg, für niedrige Dosen (0,1Gy) hingegen eine Reduktion der TNF- α Freisetzung beobachtet. Da es sich jedoch nur um ein Experiment handelt, lässt sich aus den Ergebnissen keine fundierte Aussage ableiten.

Die hier beobachtete fehlende Freisetzung von TNF- α durch unstimulierte PBL steht in guter Übereinstimmung zu publizierten Daten von Lindner et al. [93]. In dieser Publikation wurde die Freisetzung von TNF- α in PBMC in einem Zeitraum von 48 Stunden untersucht. Obwohl diese Experimente mit PBMC durchgeführt wurden, bestätigen sie die hier gezeigten Ergebnisse dahingehend, dass unbehandelte PBL - als Bestandteil von PBMC - kein TNF- α freisetzen. Auch wurde in der Arbeit von Lindner et al. eine deutliche Steigerung der TNF- α Freisetzung durch eine Stimulation mit LPS beschrieben.

Der im Rahmen der vorliegenden Arbeit beobachtete Einfluss der LPS Stimulierung auf die Freisetzung von TNF- α durch Monozyten stimmt mit Ergebnissen von Linssen et al. überein [94]. Für diesen Zelltyp liegen jedoch keine Daten zur TNF- α Freisetzung nach Bestrahlung mit ionisierender Strahlung vor.

Die hier gezeigten Ergebnisse zur TNF- α Freisetzung von Makrophagen werden durch publizierte Ergebnissen von Conrad et al. bestätigt [62, 68]. Hierbei wurde in Makrophagen ebenfalls nur nach Stimulierung mit LPS eine Steigerung der TNF- α Freisetzung beobachtet. In der Arbeit von Conrad et al. wurden jedoch keine verschiedenen Makrophagen Subtypen miteinander verglichen.

5.3.2.2 TGF- β

In der hier vorliegenden Arbeit wurden in unstimulierten PBL und Monozyten im Gegensatz zu allen untersuchten Subtypen von Makrophagen nicht messbare oder nur sehr geringe Mengen freigesetztes TGF- β detektiert. Eine LPS-Stimulierung hatte in keinem der untersuchten Zelltypen einen Einfluss auf die Freisetzung von TGF- β .

Außerdem wurden in PBL keine strahleninduzierten Veränderungen der TGF- β Freisetzung beobachtet. Im Gegensatz dazu wurde von Chen et al. nach Bestrahlung mit 12Gy γ -Strahlung eine Verdoppelung der freigesetzten Menge an TGF- β durch murine T-Lymphozyten beschrieben [95]. Ein Vergleich der beiden Ergebnisse ist jedoch nur bedingt möglich, da eine höhere Dosis verwendet wurde und es sich bei den bestrahlten Zellen in den hier gezeigten Experimenten um ein Gemisch aus B- und T-Zellen handelte.

In Monozyten wurde sowohl nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung als auch mit Kohlenstoffionen trotz der sehr geringen freigesetzten Menge eine geringfügige Abnahme der TGF- β Freisetzung beobachtet (siehe Abb. 32). Für Makrophagen, und zwar nur für den GM-CSF Subtyp, wurde trotz höher freigesetzter Gesamtmenge nur ein Trend zu einer strahleninduzierten TGF- β Freisetzung beobachtet (siehe Abb. 33).

Obwohl in der Literatur eine Freisetzung von TGF- β durch Makrophagen beschrieben ist [96, 97], liegen bis jetzt weder publizierte Daten zur strahleninduzierten Freisetzung von TGF- β durch Monozyten oder Makrophagen vor, noch gibt es einen Vergleich zwischen verschiedenen Makrophagen-Subtypen.

5.3.2.3 IL-10

In dieser Arbeit wurden weder in unstimulierten noch in zusätzlich bestrahlten Monozyten und PBL eine Freisetzung von IL-10 beobachtet. Einzig unstimulierte Makrophagen wiesen eine kontinuierliche Freisetzung von IL-10 auf (siehe Abb. 35). Der GM-CSF Subtyp zeigte dabei in allen Experimenten die niedrigste Freisetzung von IL-10. Es wurden jedoch in den verschiedenen Subtypen keine Verän-

derungen durch Röntgenstrahlung bewirkt. Nach Bestrahlung mit hohen Dosen von Kohlenstoffionen kam es hingegen sowohl in den spontan ausdifferenzierten Makrophagen als auch im M-CSF Subtyp zu einer Steigerung der Freisetzung von IL-10, während im GM-CSF Subtyp keine Veränderungen zu beobachten waren. Da es sich jedoch um nur ein Experiment handelt ist dieses Ergebnis als vorläufig zu betrachten.

Zur Veränderung der Freisetzung von IL-10 in Makrophagen durch ionisierende Strahlung wurden bis jetzt noch keine Arbeiten veröffentlicht. Allerdings entspricht die Freisetzung von IL-10 in den unbestrahlten Makrophagen den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen [91, 98]. Es konnte damit in den hier präsentierten Experimenten gezeigt werden, dass die Freisetzung von IL-10 von Makrophagen nicht durch die Bestrahlung mit Röntgenstrahlung beeinflusst wird. Ob es bei dicht-ionisierender Strahlung zu einer signifikanten Änderung kommt muss in weiteren Experimenten überprüft werden.

5.3.2.4 Fazit

Zusammenfassend kann man festhalten, dass durch die Bestrahlung in den Monokulturen nur geringfügige Veränderungen der Zytokin-Freisetzung bewirkt wurden. Mit Ausnahme des GM-CSF Subtyps wurden in fast allen untersuchten Zelltypen nur geringe Mengen TGF- β freigesetzt. Die TNF- α Freisetzung wurde erwartungsgemäß nur durch eine Stimulierung mit LPS induziert. Auch bezüglich der Freisetzung von IL-10 konnten nur geringfügige Veränderungen nach Bestrahlung beobachtet werden. Es bleibt jedoch festzuhalten, dass durch die Bestrahlung mit niedrigen Dosen keine Steigerung von TNF- α ausgelöst wird, die dann im Organismus entzündungsfördernd wirken würde. Insgesamt lassen diese Ergebnisse daher darauf schließen, dass für die entzündungshemmende Wirkung von niedrig dosierter Strahlung ein Zusammenwirken mehrerer Zelltypen notwendig ist.

5.3.3 Zytokin-Freisetzung in Co-Kulturen von Makrophagen und apoptotischen PBL

Zur Überprüfung der Hypothese, dass apoptotische Zellen eine entzündungshemmende Wirkung auf Makrophagen haben, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Zytokin-Freisetzung der Co-Kulturen von Makrophagen und apoptotischen PBL untersucht. Die Apoptose wurde hierbei in den PBL zum einen durch ionisierende Strahlung und zum anderen durch UV-B induziert.

5.3.3.1 Einfluss der apoptotischen PBL auf die Zytokin-Freisetzung der Co-Kultur

In den hier gezeigten Experimenten zur Zytokin-Freisetzung in den Co-Kulturen wurde eine Reduktion von TNF- α in keinem Experiment beobachtet (siehe Abb. 38). Hingegen wurde eine Steigerung der TGF- β Freisetzung durch die Co-Kultivierung von Makrophagen mit apoptotischen PBL detektiert (siehe Abb. 37), jedoch nur in den spontan ausdifferenzierten Makrophagen, die mit LPS stimuliert wurden. Eine Freisetzung von IL-10 wurde nur im M-CSF Subtyp durch die Co-Kultivierung mit PBL, die im Vorfeld für sieben Tage kultiviert wurden und unabhängig von Bestrahlung der PBL gesteigert (siehe Abb. 40). Im Gegensatz dazu kam es in Gegenwart von Röntgen-bestrahlten, apoptotischen

PBL, die vor der Co-Kultivierung nur für 24 Stunden inkubiert wurden, zu keiner strahleninduzierten Steigerung der Freisetzung von IL-10 (siehe Abb. 43). Dies geschah nur nach Bestrahlung mit UV-B-Strahlung.

Eine mögliche Erklärung für die Differenzen zwischen den Bestrahlungsexperimenten mit UV-B- und Röntgenstrahlung könnte in der Zahl der induzierten apoptotischen Zellen liegen, die bei der gewählten Intensität der UVB Strahlung wesentlich höher war als im untersuchten Dosisbereich der Röntgenstrahlung. Diese Aussage kann aus bereits publizierten Ergebnissen abgeleitet werden [99]. Hierbei wurde für humane T-Lymphozyten 24 Stunden nach einer Bestrahlung mit 100mJ/cm² UV-B eine Apoptoserate von ca. 90% beschrieben. Durch die Bestrahlung mit 6Gy Röntgenstrahlung wurde hingegen im gleichen Zeitraum nur eine Apoptoserate von ca. 30-40% induziert (siehe Abb. 22A). Eine abschließende Überprüfung dieser Hypothese war jedoch im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich.

Die bereits zitierten Arbeiten von Fadok et al. und Voll et al. befassen sich ebenfalls mit der Frage, ob durch Apoptose und anschließende Phagozytose potentiell entzündungshemmende Zytokine freigesetzt werden [37, 52]. So wurde bereits 1998 von Fadok et al. eine umfassende Untersuchung der Zytokin-Freisetzung (IL-1 β , IL-8, IL-10, TGF- β , TNF- α , GM-CSF) von Makrophagen in Co-Kultur mit apoptotischen Neutrophilen veröffentlicht. Hierbei wurde eine deutliche Steigerung der Freisetzung von TGF- β durch die Co-Kultivierung mit apoptotischen Zellen im Vergleich zur unstimulierten Monokultur beobachtet. In LPS aktivierten Makrophagen bewirkte die Co-Kultivierung eine deutliche Reduktion der Freisetzung von TNF- α , GM-CSF und IL-10. Diese Ergebnisse konnten in der vorliegenden Arbeit jedoch nur bezüglich der Steigerung der TGF- β Freisetzung bestätigt werden. Auch in der Arbeit von Voll et al. wurden entzündungshemmende Effekte durch die Co-Kultivierung von PBMC mit apoptotischen PBL beschrieben. Hierbei wurde durch die Co-Kultivierung im Vergleich zur Monokultur eine deutliche Steigerung der Konzentration von IL-10 sowie eine Reduktion von TNF- α und IL-1 β in LPS aktivierten PBMC beobachtet. Da in der Arbeit von Voll et al. jedoch keine Makrophagen verwendet wurden, sind diese Ergebnisse mit den hier gezeigten Experimenten nur bedingt vergleichbar.

Die Differenzen zu den Arbeiten von Fadok et al. und Voll et al. können wahrscheinlich auf die Unterschiede in der Induktion der Apoptose zurückgeführt werden, da in beiden Arbeiten ausschließlich UV-Strahlung verwendet wurde. Es ist daher anzunehmen, dass in den hier beschriebenen Experimenten nicht die gleiche Apoptoserate in den PBL induziert wurde wie in den Experimenten von Fadok et al. und Voll et al. Außerdem könnten Unterschiede in den untersuchten Zelltypen für die abweichenden Ergebnisse verantwortlich sein (Co-Kultur von PBMC mit PBL bzw. Makrophagen mit Neutrophilen).

5.3.3.2 Vergleich zwischen dem M-CSF und GM-CSF Subtyp

In den Arbeiten von Fadok et al. und Voll et al. wurden jedoch keine verschiedenen Subtypen von Makrophagen miteinander verglichen. Diese Fragestellung erscheint jedoch von besonderer Bedeutung, da die Ausdifferenzierung der Makrophagen *in vivo* unter dem Einfluss von Differenzierungsfaktoren wie M-CSF oder GM-CSF abläuft. Es ist daher anzunehmen, dass diese beiden Subtypen die Situation *in vivo* besser abbilden als die spontan ausdifferenzierten Makrophagen.

Bezüglich des Einflusses der Stimulierung mit LPS konnte im Rahmen dieser Arbeit ein deutlicher Unterschied zwischen dem M-CSF und GM-CSF Subtyp in der Freisetzung von IL-10 beobachtet werden. Hierbei zeigte sich in der Monokultur der beiden Subtypen, dass der M-CSF Subtyp mit einer weitaus stärkeren Freisetzung von IL-10 auf eine Stimulierung mit LPS reagierte (siehe Abb. 40). Diese Beobachtung steht in guter Übereinstimmung mit publizierten Ergebnissen von Xu et al. und Yamazaki et al. [91, 98]. In beiden Arbeiten wurden die zwei genannten Subtypen im Bezug auf die Freisetzung potentiell entzündungshemmender Zytokine nach Co-Kultivierung mit apoptotischen Zellen miteinander verglichen. Die Apoptose wurde hierbei im Vorfeld der Co-Kultur mit Etoposid induziert. Es wurden jedoch keine primären PBL, sondern etablierte Zelllinien (human oder murin) für die Co-Kultur verwendet.

Des Weiteren zeigte sich in den hier präsentierten Ergebnissen, dass nur der unstimulierte M-CSF Subtyp mit einer Steigerung der Freisetzung von IL-10 durch die Co-Kultivierung mit apoptotischen PBL, die 7 Tage vorher kultiviert worden waren, reagierte (siehe Abb. 40). Allerdings trat dieser Effekt nicht in allen Experimenten auf und war zudem unabhängig von der Bestrahlung der PBL mit Röntgenstrahlung. Unterstützt werden diese Beobachtungen von den Ergebnissen von Yamazaki et al. [98]. Hierbei wurde durch die Co-Kultivierung des M-CSF Subtyps mit spät-apoptotischen Zellen eine Steigerung der Freisetzung von IL-10 bewirkt. Im Gegensatz dazu konnte jedoch in der Arbeit von Xu et al. keine Steigerung der Freisetzung von IL-10 durch apoptotische Zellen in der Co-Kultur beobachtet werden.

5.3.3.3 Fazit

Insgesamt zeigt sich in den bereits publizierten Arbeiten sowie in den hier präsentierten Ergebnissen kein einheitliches Bild der Wirkung von apoptotischen Zellen auf Phagozyten. Während in der Mehrheit der Arbeiten eine Steigerung von anti-inflammatorischen und eine Reduktion von pro-inflammatorischen Zytokinen beschrieben wird, war dies in den hier und in einigen Publikationen präsentierten Experimenten nicht der Fall. Beim Vergleich der einzelnen Arbeiten fällt auf, dass die zur Induktion der Apoptose verwendete Noxe einen Einfluss auf die Freisetzung von Zytokinen hat. Dies deutet darauf hin, dass die Höhe der induzierten Apoptoserate die Reaktion der Phagozyten beeinflussen kann.

Des Weiteren konnte in den hier beschriebenen Ergebnissen aufgezeigt werden, dass die Zytokin-Freisetzung auch von den vorliegenden Subtypen der Makrophagen abhängt, die durch die Phagozytose von apoptotischen Zellen unterschiedlich stimuliert werden. In Übereinstimmung mit den bereits publizierten Arbeiten konnte die entzündungshemmende Funktion des M-CSF Subtyps in dieser Arbeit bestätigt werden [91, 98]. In Kombination mit der erhöhten phagozytotischen Aktivität wird damit die Hypothese unterstützt, dass dieser Subtyp für die Beseitigung von apoptotischen Zellen verantwortlich ist. Dies prädestiniert ihn als Modellsystem für die weitere Erforschung der Phagozytose von apoptotischen Zellen sowie deren immunmodulatorischen Auswirkungen.

5.4 Untersuchung von *in vivo* Effekten der Radontherapie

Um einen Bezug zwischen den hier präsentierten Ergebnissen aus den *in vitro* Experimenten und der Situation *in vivo* herzustellen, wurden Blutproben von Patienten untersucht, die eine Radontherapie erhielten. Hierzu wurde die Induktion von Apoptose in PBMC sowie eine mögliche Veränderung der Zytokinkonzentration im Plasma untersucht. Es sollte hierbei zum einen überprüft werden, ob durch die Bestrahlung eine messbare Steigerung der Apoptose verursacht wurde und zum anderen ob dadurch eine entzündungshemmende Reaktion ausgelöst wird.

5.4.1 Steigerung der Apoptoserate in PBMC

In den hier präsentierten Ergebnissen konnte erstmals gezeigt werden, dass die Bestrahlung während der Radontherapie möglicherweise die Apoptoserate in PBMC beeinflussen kann. Leider konnte im Rahmen dieser Arbeit nur eine sehr begrenzte Zahl von Probanden untersucht werden. Aus diesem Grund ist es nicht möglich eine statistisch fundierte Aussage aus den Ergebnissen abzuleiten. Allerdings konnte festgestellt werden, dass in Abhängigkeit von der Strahlungsexposition (Einfahrten in den Stollen) Unterschiede zwischen den Probanden zu beobachten waren (siehe Abb. 45). So wurde die Apoptoserate in allen Probanden, die nur drei Anwendungen erhielten reduziert, während sie in den Probanden die fünf Anwendungen erhielten mehrheitlich gesteigert wurde. Allerdings wurde in der unbestrahlten Kontrollgruppe ebenfalls für einen Proband eine Steigerung der Apoptoserate beobachtet. Dies lässt auf eine große Variationsbreite schließen, die wiederum eine klare Aussage über die Induktion von Apoptose durch Radon basierend auf den gesammelten Daten erschwert.

Ein ähnlicher Trend zur Induktion von Apoptose durch niedrige Dosen ionisierender Strahlung wurden in einer Studie in Mäusen von Bogdándi et al. gemacht [100]. Nach einer einmaligen Ganzkörperbestrahlung der Tiere mit niedrigen Dosen γ -Strahlung wurde die Steigerung der Apoptoserate in verschiedenen Subpopulationen muriner Milzleukozyten untersucht, entsprechend dem Trend zur erhöhten Apoptoserate in Patienten mit mehreren Anwendungen innerhalb einer Radontherapie. So wurde bereits vier Stunden nach Bestrahlung eine signifikante Zunahme von Apoptose beobachtet, allerdings erst ab 0,5Gy, während die Induktion von Apoptose bei niedrigeren Dosen (0,01-0,1Gy)

unterhalb der Spontanrate lag, was dem Trend zu einer niedrigen Apoptoserate nach wenigen Anwendungen in der Radontherapie entsprechen könnte.

Allerdings ist die Vergleichbarkeit von Radon-Exposition und γ -Bestrahlung nur bedingt gegeben, da die Dosisverteilung bei einer Radonexposition aufgrund der physikalischen Eigenschaften der emittierten α -Teilchen inhomogen ist. So werden einzelne Lymphozyten einer Dosis von etwa 0,2Gy ausgesetzt, was dem Durchgang eines α -Teilchens entspricht, während viele Lymphozyten nicht bestrahlt werden. Diese Dosis pro Zelle entspricht in etwa dem in der Arbeit von Bogdandi et al. verwendeten Dosisbereich, allerdings wird bei der Radon-Exposition nur etwa 4 μ Gy pro Anwendung im Gewebe deponiert [12].

In der Arbeit von Ootsuyama et al. wurde ebenfalls für niedrige Dosen im Bereich von 0,05-0,5Gy/Tag (1-10Gy Gesamtdosis) eine deutliche Erhöhung der Apoptose gegenüber der Spontanrate nach Ganzkörperbestrahlung (γ -Strahlung) in murinen T-Lymphozyten beschrieben [101]. Auch in weiteren Arbeiten wird die hohe Strahlensensitivität von PBMC nach einer Ganzkörperbestrahlung beschrieben [102, 103]. Zusammengenommen kann damit festgehalten werden, dass eine Erhöhung der Apoptoserate in PBMC durch wiederholte Radon-Anwendungen während einer Therapie auch bei den hierbei applizierten Dosen denkbar ist.

5.4.2 Veränderung der Zytokinkonzentration im Blutplasma

Bezüglich der Zytokinkonzentration im Blutplasma von Patienten, die sich einer Radontherapie unterzogen haben, konnten in dieser Arbeit keine strahleninduzierten Veränderungen beobachtet werden. Die Faktoren TNF- α und M-CSF wurden in den meisten Probanden nicht nachgewiesen (siehe Abb. 48 und Abb. 49). Bezüglich des M-CSF wurden in zwei Probanden durch die Radon-Anwendungen deutliche, aber gegensätzlichen Veränderungen beobachtet. Die Aussagekraft dieser einzelnen Ergebnisse ist aber nur sehr gering.

Die Zytokine TGF- β und IL-10 konnten in allen Probanden nachgewiesen werden (siehe Abb. 46 und Abb. 47). Hier zeigten sich jedoch große Unterschiede zwischen den einzelnen Spendern. Dabei kam es entweder zu einer Steigerung, einer Reduktion oder zu keinen Veränderungen der Konzentration im Vergleich zu den Werten in den Proben vor Therapiebeginn. Für TGF- β war in den meisten Probanden keine Veränderung zu beobachten. Im Gegensatz dazu war für IL-10 in den meisten Probanden eine Steigerung feststellbar. Allerdings handelt es sich auch hier um eine geringe Anzahl von untersuchten Probanden.

Die großen interindividuellen Unterschiede bezüglich der TGF- β Konzentration, die sich bei den Messungen der Zytokinkonzentration im Blut der Probanden gezeigt haben, werden ebenfalls in der Arbeit von Shehata et al. beschrieben [104]. In der Publikation wurden hierbei deutliche Unterschiede in den Veränderungen im Verlauf der Therapie bei einzelnen Radontherapie-Patienten beobachtet.

Bei der Mehrzahl der Probanden kam es jedoch zu einer Erhöhung der TGF- β Konzentration. In der Beurteilung der hier präsentierten Daten in Verbindung mit den bereits publizierten Ergebnissen ergibt sich, dass hieraus keine eindeutigen Rückschlüsse auf eine mögliche entzündungshemmende Wirkung der Bestrahlung gezogen werden können. Aufgrund des heterogenen Erscheinungsbildes kann kein direkter Zusammenhang zwischen der Radontherapie und den Veränderungen der Zytokinkonzentration hergestellt werden. Die sehr unterschiedlichen Reaktionen der Patienten im Bezug auf die Veränderung der jeweiligen Zytokin-Konzentration deuten auf eine große spenderabhängige Variationsbreite hin.

5.5 Fazit

Die Ergebnisse der hier präsentierten Arbeit bestätigen die Annahme, dass eine Induktion der Apoptose in PBL durch ionisierende Strahlung bereits im Niedrig-Dosis-Bereich erfolgt. Dies spricht dafür, dass auch in der Radontherapie der Prozess der Apoptose eine wichtige Rolle für die Auslösung der entzündungshemmenden Effekte spielt und damit am Anfang der strahleninduzierten Reaktionskaskade steht. Die hohe Strahlensensitivität der PBL, die auch *in vivo* gezeigt wurde [100], zeichnet sie als eine der Zielzellen der Niedrig-Dosis-Bestrahlung aus. Unklar bleibt jedoch, ob auch durch die Radontherapie eine Steigerung der Apoptose bewirkt wird, da aus den hier gezeigten Ergebnissen im Blut von Patienten keine eindeutige Schlussfolgerung gezogen werden kann.

In den Experimenten zur Phagozytose von apoptotischen Zellen konnte für Makrophagen eine dosisabhängige Beziehung zwischen der phagozytotischen Aktivität und der Induktion von Apoptose aufgezeigt werden. Hierbei konnte jedoch weder für die Bestrahlung mit beschleunigten Ionen noch für Röntgenstrahlung ein explizierter Niedrig-Dosis-Effekt beobachtet werden. Eine mögliche entzündungshemmende Wirkung durch die Phagozytose von apoptotischen Zellen und eine dadurch veränderte Freisetzung von Zytokinen konnte in den hier gezeigten Ergebnissen nicht bestätigt werden.

Im Hinblick auf eine Veränderung der Zytokin-Freisetzung in den Monokulturen der potentiell beteiligten Zelltypen nach Bestrahlung, konnte im Rahmen dieser Arbeit kein Niedrig-Dosis-Effekt beobachtet werden. Auch in den *in vivo* Untersuchungen konnten keine dosisabhängigen Veränderungen der Zytokin-Konzentration im Blutplasma festgestellt werden.

In den Untersuchungen zur Veränderung der Adhäsion von PBL an Endothelzellen nach Bestrahlung konnten die Ergebnisse bereits publizierter Arbeiten bestätigt werden [24]. Hierbei wurde in den Hybrid-Endothelzellen ein dezidiertes Niedrig-Dosis-Effekt bezüglich der Adhäsion beobachtet. Die Adhäsion wurde in diesen Zellen ausschließlich im Niedrig-Dosis-Bereich inhibiert, während für hohe Dosen keine Wirkung beobachtet werden konnte. Dies ist im Einklang mit der Tatsache, dass dicht-ionisierende Strahlung, die generell eine höhere biologische Wirksamkeit aufweist als Röntgenstrahlung, keine Reduktion der Adhäsion bewirkte.

Um den Verhältnissen im Gewebe näher zu kommen, wurden im Rahmen dieser Arbeit erstmalig primäre humane Zellen bezüglich einer Veränderung der Adhäsion durch Bestrahlung untersucht. In Endothelzellen aus den mikrovaskulären Gefäßen der Haut (HMVEC) wurde eine deutliche Reduktion der Adhäsion durch die Bestrahlung bewirkt. Allerdings handelte es sich hierbei nicht um einen Niedrig-Dosis-Effekt, da die Reduktion der Adhäsion sowohl nach Bestrahlung mit niedrigen als auch mit hohen Dosen auftrat. Diese Feststellung deckt sich mit der Beobachtung, dass auch die Bestrahlung mit Kohlenstoffionen im Gegensatz zur Hybrid-Endothelzelllinie eine Reduktion der Adhäsion in HMVEC bewirkte. Die Bedeutung der Reduktion der Adhäsion nach Bestrahlung wurde durch die Experimente unter dynamischen Bedingungen bestätigt. In diesem Testsystem wurde die Adhäsion sogar weitaus stärker inhibiert als im statischen System. Eine mögliche Erklärung bezüglich der Feststellung, dass in den primären Endothelzellen kein Niedrig-Dosis-Effekt beobachtet wurde, könnte eine nicht ausreichende Komplexität des in dieser Arbeit verwendeten Testsystems sein, da im Organismus weitaus mehr Zellen am Prozess der Extravasation beteiligt sind. Durch die Ergebnisse zur Adhäsion für primäre Endothelzellen werden die Ergebnisse bezüglich der Adhäsionsminderung in der Hybrid-Endothelzelllinie relativiert.

Es hat sich in den hier präsentierten Ergebnissen gezeigt, dass TGF- β eine essentielle Rolle in der strahleninduzierten Adhäsionsreduktion spielt. Dies konnte sehr klar in den hier präsentierten Neutralisierungsexperimenten nachgewiesen werden. In den Versuchen konnte eindeutig gezeigt werden, dass eine Inhibierung von aktivem TGF- β zu einer Aufhebung des Strahlungseffekts führt. Diese Beobachtung wurde auch bereits *in vivo* beschrieben [49]. Unklar bleibt jedoch, in welcher spezifischen Weise TGF- β an der Regulation der Adhäsion beteiligt ist, da eine externe Stimulierung der Endothelzellen mit aktivem TGF- β keine Veränderung der Adhäsion bewirkt.

Insgesamt konnten damit in den hier gezeigten Ergebnissen wichtige Erkenntnisse bezüglich der entzündungshemmenden Effekte der Niedrig-Dosis-Strahlentherapie gewonnen werden, besonders im Bezug auf die Induktion von Apoptose sowie auf die Inhibition der Adhäsion. Zusammengefasst wurde jedoch in der Mehrzahl der hier präsentierten Ergebnisse kein dezidiert Niedrig-Dosis-Effekt festgestellt.

5.6 Ausblick

Die aus den hier präsentierten Ergebnissen gewonnenen Erkenntnisse heben die Bedeutung der Induktion von Apoptose und der Reduktion der Adhäsion für die entzündungshemmenden Effekte der Niedrig-Dosis-Bestrahlung deutlich hervor. Die in dieser Arbeit etablierten Testsysteme bieten dabei eine gute Ausgangsbasis zur Ausweitung der Untersuchungen unter Einbeziehung weiterer Zelltypen, sowie zur Erforschung von weiteren beteiligten Molekülen.

Hierbei wäre zunächst die Klärung der Fragestellung anhand von Patientenmaterial von großer Bedeutung, ob durch die Radontherapie eine signifikante Steigerung der Apoptose erfolgt. Hierzu würden sich auch *in vivo* Experimente in Tiermodellen eignen, da hierzu bereits vergleichbare Publikationen mit dünn-ionisierender Strahlung vorliegen. Des Weiteren wäre die Fortführung der Experimente zur entzündungshemmenden Wirkung der Phagozytose apoptotischer Zellen von großer Bedeutung für das Verständnis der therapeutischen Wirkung der Niedrig-Dosis-Bestrahlung. Hierbei wäre vor allem die Frage zu klären, ob die Abhängigkeit der phagozytotischen Aktivität von der induzierten Apoptose auch auf die Ausschüttung anti-inflammatorischer Zytokine übertragbar ist. Es stellt sich dabei die Frage, ob eine wiederholte Anwendung niedriger Dosen eine Voraussetzung dafür ist, eine entzündungshemmende Reaktion der Phagozyten auszulösen. Des Weiteren erscheint es sinnvoll den Kreis der zu untersuchenden Zytokine auszuweiten, um weitere an diesem Prozess beteiligte Moleküle zu identifizieren.

Bezüglich der Adhäsion bietet das in dieser Arbeit etablierte dynamische Testsystem ein geeignetes Modell zur weiteren Untersuchung der molekularen Mechanismen, die diesem Effekt zugrunde liegen. Mögliche Untersuchungsfelder wären hierbei die Expression von Adhäsionsmolekülen sowie die Identifikation weiterer molekularer Faktoren, die an diesem Prozess beteiligt sind. Besonders Moleküle aus der Gruppe der Chemokine (IL-8, IL-6, CCL20) wurden in einigen kürzlich publizierten Arbeiten in Verbindung mit der Regulation der Adhäsion gebracht [36, 83, 87]. Des Weiteren wäre es sinnvoll, in diesem Zusammenhang die Rolle von Transkriptionsfaktoren sowie den zugehörigen Genen zu untersuchen. Besonders die Rolle der Smad-Moleküle als Bestandteil des TGF- β Signalwegs ist für die Aufklärung der zugrunde liegenden Mechanismen von großem Interesse. Unabhängig von der jeweiligen Fragestellung sollte in allen Untersuchungsfeldern ein Vergleich von dünn- und dicht-ionisierender Strahlung durchgeführt werden, um mögliche Unterschiede in der Wirkungsweise der Radontherapie zur Niedrig-Dosis-Strahlentherapie mit Photonen aufzuklären.

6 Anhang

Literaturverzeichnis

- 1 Rödel, F., et al., Functional and molecular aspects of anti-inflammatory effects of low-dose radiotherapy. Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie, Universität Erlangen-Nürnberg. franz.roedel@strahlen.med.uni-erlangen.de. *Strahlenther Onkol.*, Jan. 2002: 1–9.
- 2 Seegenschmiedt, M. H., Micke, O. und Willich, N., Radiation therapy for nonmalignant diseases in Germany. Current concepts and future perspectives. *Strahlenther Onkol.* 2004. 180(11): 718–730.
- 3 Trott, K. R. und Kamprad, F., Radiobiological mechanisms of anti-inflammatory radiotherapy. *Radiother Oncol.* 1999. 51(3): 197–203.
- 4 Seegenschmiedt, M. H. und Keilholz, L., Epicondylopathia humeri (EPH) and peritendinitis humeroscapularis (PHS): evaluation of radiation therapy long-term results and literature review. *Radiother Oncol.* 1998. 47(1): 17–28.
- 5 Fröhlich, D., Baaske, D. und Glatzel, M., Strahlentherapie der Hidradenitis axillaris--heute noch aktuell? *Strahlenther Onkol.* 2000. 176(6): 286–289.
- 6 Keilholz, L., Seegenschmiedt, M. H. und Kutzki, D., Sauer, R., Periarthritis humeroscapularis (PHS). Indikation, Technik und Bestrahlungsergebnisse. *Strahlenther Onkol.* 1995. 171(7): 379–384.
- 7 Seegenschmiedt, M. H., Olschewski, T. und Guntrum, F., Radiotherapy optimization in early-stage Dupuytren's contracture: first results of a randomized clinical study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2001. 49(3): 785–798.
- 8 Trott, K. R., Therapeutic effects of low radiation doses. *Strahlenther Onkol.* 1994. 170(1): 1–12.
- 9 Herold, M. und Lind-Albrecht, G., Radon im Behandlungskonzept der Spondylitis ankylosans. *Wien Med Wochenschr.* 2008. 158(7-8): 209–212.
- 10 Ortwin Rave, Die Bechterew'sche Krankheit.
<http://www.rheuma-liga.de/uploads/3/Merkblatt%201.4neu.pdf>. Zugriff 7. November 2011.
- 11 van Tubergen, A. und Hidding, A., Spa and exercise treatment in ankylosing spondylitis: fact or fancy? *Best practice & research. Clinical rheumatology.* 2002. 16(4): 653–666.
- 12 Deetjen, P., *Radon als Heilmittel: Einführung und Auszug aus der wissenschaftlichen Bewertung ; medizinisch-biologische Wirkungsmechanismen und vergleichende Risikobewertung.* Radiz Schlema e.V., Schlema 2004.
- 13 Wannenmacher, M. (Ed.) *Strahlentherapie: Mit 306 Tabellen.* Springer, Berlin [u.a.] 2006.

- 14 Hall, E. J. und Giaccia, A. J., *Radiobiology for the radiologist*, 6th edn. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2006.
- 15 Kraft, G., Krämer, M. und Scholz, M., LET, track structure and models. A review. *Radiat Environ Biophys.* 1992. 31(3): 161–180.
- 16 Gesellschaft für Schwerionenforschung mbH, D., GSI - Ionenstrahlen im Kampf gegen Krebs: Tumorthherapie an der GSI. <http://www.gsi.de/documents/DOC-2006-May-25-2.pdf>. Zugriff 6. Dezember 2011.
- 17 Bundesamt für Strahlenschutz, Gesundheitliche Auswirkungen von Radon in Wohnungen. http://www.bfs.de/de/ion/ion/wirkungen/radon_ges.html.
- 18 Staines, N., Brostoff, J. und James, K., Hess, Max W., *Immunologisches Grundwissen*, 3rd edn. G. Fischer, Stuttgart ; Jena ; Lübeck ; Ulm 1997.
- 19 Charles A. Janeway, *Immunologie*, 5th edn. Spektrum, Heidelberg 2002.
- 20 K. Wielckens, Die Erythropoese und ihre Störungen.
http://www.uk-koeln.de/institute/kchemie/Lehre/Vorlesung/B_Erythropoese/Erythropoese.pdf.
Zugriff 3. Oktober 2011.
- 21 Feghali, C. A. und Wright, T. M., Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front. Biosci.* 1997. 2: d12-26.
- 22 Prud'homme, G. J., Pathobiology of transforming growth factor beta in cancer, fibrosis and immunologic disease, and therapeutic considerations. *Lab. Invest.* 2007. 87(11): 1077–1091.
- 23 Hehlhans, T. und Pfeffer, K., The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1782125/pdf/imm0115-0001.pdf>. Zugriff 8. November 2011.
- 24 Rödel, F., Schaller, U. und Schultze-Mosgau, S., Beuscher, H.-U., Keilholz, L., Herrmann, M., Voll, R. *et al.*, The induction of TGF-beta(1) and NF-kappaB parallels a biphasic time course of leukocyte/endothelial cell adhesion following low-dose X-irradiation. *Strahlentherapie und Onkologie Organ der Deutschen Röntgengesellschaft [et al]*. 2004. 180(4): 194–200.
- 25 Grütz, G., New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. *J. Leukoc. Biol.* 2005. 77(1): 3–15.
- 26 Hamilton, J. und Anderson, G., GM-CSF Biology. *Growth Factors*. 2004. 22(4): 225–231.

- 27 Li, G., Kim, Y.-J. und Broxmeyer, H. E., Macrophage colony-stimulating factor drives cord blood monocyte differentiation into IL-10(high)IL-12absent dendritic cells with tolerogenic potential. *J. Immunol.* 2005. 174(8): 4706–4717.
- 28 Wiktor-Jedrzejczak, W., Bartocci, A. und Ferrante, A. W., Ahmed-Ansari, A., Sell, K. W., Pollard, J. W., Stanley, E. R., Total absence of colony-stimulating factor 1 in the macrophage-deficient osteopetrotic (op/op) mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1990. 87(12): 4828–4832.
- 29 Stanley, E. R., Berg, K. L. und Einstein, D. B., Lee, P. S., Pixley, F. J., Wang, Y., Yeung, Y. G., Biology and action of colony--stimulating factor-1. *Mol. Reprod. Dev.* 1997. 46(1): 4–10.
- 30 Ley, K., *Adhesion molecules: Function and inhibition.* Birkhauser, Basel ;, Boston 2007.
- 31 Sage, P. T. und Carman, C. V., Settings and mechanisms for trans-cellular diapedesis. *Front. Biosci.* 2009. 14: 5066–5083.
- 32 Taylor, R. C., Cullen, S. P. und Martin, S. J., Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2008. 9(3): 231–241.
- 33 Platt, N., da Silva, R. P. und Gordon, S., Recognizing death: the phagocytosis of apoptotic cells. *Trends Cell Biol.* 1998. 8(9): 365–372.
- 34 Lauber, K., Blumenthal, S. und Waibel, M., Wesselborg, S., Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses. *Mol Cell.* 2004. 14(3): 277–287.
- 35 Somersan, S., Tethering and tickling: a new role for the phosphatidylserine receptor. *The Journal of Cell Biology.* 2001. 155(4): 501–504.
- 36 Rödel, F., Hofmann, D. und Auer, J., Keilholz, L., Röllinghoff, M., Sauer, R., Beuscher, H. U., The anti-inflammatory effect of low-dose radiation therapy involves a diminished CCL20 chemokine expression and granulocyte/endothelial cell adhesion. *Strahlentherapie und Onkologie Organ der Deutschen Röntgengesellschaft [et al].* 2008. 184(1): 41–47.
- 37 Voll, R. E., Herrmann, M. und Roth, E. A., Stach, C., Kalden, J. R., Girkontaite, I., Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature.* 1997. 390(6658): 350–351.
- 38 Fadok, V. A., Warner, M. L. und Bratton, D. L., Henson, P. M., CD36 is required for phagocytosis of apoptotic cells by human macrophages that use either a phosphatidylserine receptor or the vitronectin receptor (alpha v beta 3). *J. Immunol.* 1998. 161(11): 6250–6257.
- 39 Fadok, V. A. und Chimini, G., The phagocytosis of apoptotic cells. *Semin. Immunol.* 2001. 13(6): 365–372.

- 40 Gaipf, U. S., Munoz, L. E. und Rödel, F., Pausch, F., Frey, B., Brachvogel, B., Mark, K. von der, Pöschl, E., Modulation of the immune system by dying cells and the phosphatidylserine-ligand annexin A5. *Autoimmunity*. 2007. 40(4): 254–259.
- 41 Prise, K. M. und O'Sullivan, J. M., Radiation-induced bystander signalling in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*. 2009. 9(5): 351–360.
- 42 Edgell, C. J., McDonald, C. C. und Graham, J. B., Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1983. 80(12): 3734–3737.
- 43 Freyberg, M. A., Kaiser, D. und Graf, R., Vischer, P., Friedl, P., Integrin-associated protein and thrombospondin-1 as endothelial mechanosensitive death mediators. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000. 271(3): 584–588.
- 44 Young, B., Heath, J. W. und Stevens, A., Lowe, James Steven, Deakin, Philip J., *Wheater's histologia funcional: Texto y atlas en color*, 4th edn. Harcourt, Madrid [etc.] D.L. 2001.
- 45 Nasonova, E. und Ritter, S., Cytogenetic effects of densely ionising radiation in human lymphocytes: impact of cell cycle delays. *Cytogenet. Genome Res.* 2004. 104(1-4): 216–220.
- 46 Haberer, T., *Magnetic scanning system for heavy ion therapy*. GSI, Darmstadt 1993.
- 47 Heeg, P., Hartmann, G. und Jäkel, O., Karger, C., Kraft, G., Quality assurance at the heavy-ion therapy facility at GSI. *Strahlenther Onkol.* 1999. 175 Suppl 2: 36–38.
- 48 Lee, R., Nasonova, E. und Ritter, S., Chromosome aberration yields and apoptosis in human lymphocytes irradiated with Fe-ions of differing LET. *Adv Space Res.* 2005. 35(2): 268–275.
- 49 Arenas, M., Gil, F. und Gironella, M., Hernández, V., Jorcano, S., Biete, A., Piqué, J. M., Panés, J., Anti-inflammatory effects of low-dose radiotherapy in an experimental model of systemic inflammation in mice. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2006. 66(2): 560–567.
- 50 Anna-Sophia Bothe, *Einfluss von Scherstress auf zelluläre und molekulare Aspekte der Lymphozyten Adhäsion nach Einwirkung von ionisierender Strahlung*. Bachelorarbeit, Darmstadt 2011.
- 51 M. A. Freyberg, The use of a conventional tissue culture plate as an optically accessible perfusion chamber for in situ assays and for long-term cultivation of mammalian cells. *Cytotechnology*: 49–58.
- 52 Fadok, V. A., Bratton, D. L. und Konowal, A., Freed, P. W., Westcott, J. Y., Henson, P. M., Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J. Clin. Invest.* 1998. 101(4): 890–898.

- 53 Koopman, G., Reutelingsperger, C. P. und Kuijten, G. A., Keehnen, R. M., Pals, S. T., van Oers, M. H., Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*. 1994. 84(5): 1415–1420.
- 54 Martin, S. J., Reutelingsperger, C. P. und McGahon, A. J., Rader, J. A., van Schie, R. C., LaFace, D. M., Green, D. R., Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J. Exp. Med*. 1995. 182(5): 1545–1556.
- 55 Fadok, V. A., Bratton, D. L. und Rose, D. M., Pearson, A., Ezekewitz, R. A., Henson, P. M., A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature*. 2000. 405(6782): 85–90.
- 56 Gerke, V. und Moss, S. E., Annexins: from structure to function. *Physiol. Rev*. 2002. 82(2): 331–371.
- 57 Gorczyca, W., Gong, J. und Darzynkiewicz, Z., Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res*. 1993. 53(8): 1945–1951.
- 58 Negoescu, A., Lorimier, P. und Labat-Moleur, F., Drouet, C., Robert, C., Guillermet, C., Brambilla, C., Brambilla, E., In situ apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations. *J. Histochem. Cytochem*. 1996. 44(9): 959–968.
- 59 Darzynkiewicz, Z., Galkowski, D. und Zhao, H., Analysis of apoptosis by cytometry using TUNEL assay. *Methods*. 2008. 44(3): 250–254.
- 60 Meijer, A. E., Kronqvist, U. S. und Lewensohn, R., Harms-Ringdahl, M., RBE for the induction of apoptosis in human peripheral lymphocytes exposed in vitro to high-LET radiation generated by accelerated nitrogen ions. *Int. J. Radiat. Biol*. 1998. 73(2): 169–177.
- 61 Cao, M., Cabrera, R. und Xu, Y., Liu, C., Nelson, D., Different radiosensitivity of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells and effector T cells to low dose gamma irradiation in vitro. *Int. J. Radiat. Biol*. 2011. 87(1): 71–80.
- 62 Conrad, S., Ritter, S. und Fournier, C., Nixdorff, K., Differential effects of irradiation with carbon ions and x-rays on macrophage function. *J. Radiat. Res*. 2009. 50(3): 223–231.
- 63 Alexander Helm, *Wirkung von Ionen- und Roentgenstrahlen auf humane Endothelzellen*. Diplomarbeit, Darmstadt 2009.
- 64 Gaugler, M. H., Squiban, C. und van der Meeren, A., Bertho, J. M., Vandamme, M., Mouthon, M. A., Late and persistent up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression by ionizing radiation in human endothelial cells in vitro. *Int. J. Radiat. Biol*. 1997. 72(2): 201–209.

-
- 65 Aljona Groo, *Signaltransduktion der entzündungsrelevanten Zytokine in Lymphozyten und Endothelzellen*. Diplomarbeit, Darmstadt 2010.
- 66 Schmitz, A., Bayer, J. und Déchamps, N., Thomas, G., Intrinsic susceptibility to radiation-induced apoptosis of human lymphocyte subpopulations. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2003. 57(3): 769–778.
- 67 Schmitz, A., Bayer, J. und Dechamps, N., Goldin, L., Thomas, G., Heritability of susceptibility to ionizing radiation-induced apoptosis of human lymphocyte subpopulations. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2007. 68(4): 1169–1177.
- 68 Sandro Conrad, *Reaktionen von Zellen des Immunsystems auf Bestrahlung mit Kohlenstoffionen und Röntgenstrahlung*. Dissertation, Darmstadt 2007.
- 69 Daniela Kraft geb. Becker, *Strahlenantwort von hämatopoetischen Stammzellen nach Bestrahlung mit hochenergetischen schweren Ionen*. Dissertation, Frankfurt 2010.
- 70 Benderitter, Clearance of Radiation-Induced Apoptotic Lymphocytes: Ex Vivo Studies and an In Vitro Co-culture Model. *Radiation Research*. 2002. 158(4): 464–474.
- 71 Langley, R. E., Bump, E. A. und Quartuccio, S. G., Medeiros, D., Braunhut, S. J., Radiation-induced apoptosis in microvascular endothelial cells. *Br. J. Cancer*. 1997. 75(5): 666–672.
- 72 Nübel, T., Damrot, J. und Roos, W. P., Kaina, B., Fritz, G., Lovastatin protects human endothelial cells from killing by ionizing radiation without impairing induction and repair of DNA double-strand breaks. *Clin. Cancer Res.* 2006. 12(3 Pt 1): 933–939.
- 73 Paris, F., Fuks, Z. und Kang, A., Capodieci, P., Juan, G., Ehleiter, D., Haimovitz-Friedman, A. *et al.*, Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. *Science*. 2001. 293(5528): 293–297.
- 74 Peña, L. A., Fuks, Z. und Kolesnick, R. N., Radiation-induced apoptosis of endothelial cells in the murine central nervous system: protection by fibroblast growth factor and sphingomyelinase deficiency. *Cancer Res.* 2000. 60(2): 321–327.
- 75 Kern, P. M., Keilholz, L. und Forster, C., Hallmann, R., Herrmann, M., Seegenschmiedt, M. H., Low-dose radiotherapy selectively reduces adhesion of peripheral blood mononuclear cells to endothelium in vitro. *Radiother Oncol.* 2000. 54(3): 273–282.
- 76 Colden-Stanfield, M., Kalinich, J. F. und Gallin, E. K., Ionizing radiation increases endothelial and epithelial cell production of influenza virus and leukocyte adherence. *J. Immunol.* 1994. 153(11): 5222–5229.

- 77 Hallahan, D. E., Virudachalam, S. und Kuchibhotla, J., Nuclear factor kappaB dominant negative genetic constructs inhibit X-ray induction of cell adhesion molecules in the vascular endothelium. *Cancer Res.* 1998. 58(23): 5484–5488.
- 78 Son, E. W., Cho, C. K. und Rhee, D. K., Pyo, S., Inhibition of gamma-irradiation induced adhesion molecules and NO production by alginate in human endothelial cells. *Arch. Pharm. Res.* 2001. 24(5): 466–471.
- 79 Prabhakarparandian, B., Goetz, D. J. und Swerlick, R. A., Chen, X., Kiani, M. F., Expression and functional significance of adhesion molecules on cultured endothelial cells in response to ionizing radiation. *Microcirculation.* 2001. 8(5): 355–364.
- 80 Vereycken-Holler, V., Aigueperse, J. und Gaugler, M. H., Radiation effects on circulating and endothelial cell interactions studied by quantitative real-time videomicroscopy. *Int. J. Radiat. Biol.* 2002. 78(10): 923–930.
- 81 Heckmann, M., Douwes, K. und Peter, R., Degitz, K., Vascular activation of adhesion molecule mRNA and cell surface expression by ionizing radiation. *Exp. Cell Res.* 1998. 238(1): 148–154.
- 82 Hallahan, D. E. und Virudachalam, S., Intercellular adhesion molecule 1 knockout abrogates radiation induced pulmonary inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997. 94(12): 6432–6437.
- 83 Yuan, L., Nikolova-Krstevski, V. und Zhan, Y., Kondo, M., Bhasin, M., Varghese, L., Yano, K. *et al.*, Antiinflammatory effects of the ETS factor ERG in endothelial cells are mediated through transcriptional repression of the interleukin-8 gene. *Circ. Res.* 2009. 104(9): 1049–1057.
- 84 Gamble, J. R. und Vadas, M. A., Endothelial cell adhesiveness for human T lymphocytes is inhibited by transforming growth factor-beta 1. *J. Immunol.* 1991. 146(4): 1149–1154.
- 85 Suzuki, Y., Tanigaki, T. und Heimer, D., Wang, W., Ross, W. G., Murphy, G. A., Sakai, A. *et al.*, TGF-beta 1 causes increased endothelial ICAM-1 expression and lung injury. *J. Appl. Physiol.* 1994. 77(3): 1281–1287.
- 86 Kiyohara, H., Ishizaki, Y. und Suzuki, Y., Katoh, H., Hamada, N., Ohno, T., Takahashi, T. *et al.*, Radiation-induced ICAM-1 expression via TGF-β1 pathway on human umbilical vein endothelial cells; comparison between X-ray and carbon-ion beam irradiation. *J. Radiat. Res.* 2011. 52(3): 287–292.
- 87 McGettrick, H. M., Smith, E. und Filer, A., Kissane, S., Salmon, M., Buckley, C. D., Rainger, G. E., Nash, G. B., Fibroblasts from different sites may promote or inhibit recruitment of flowing lymphocytes by endothelial cells. *Eur. J. Immunol.* 2009. 39(1): 113–125.
- 88 Schwachula, A., Riemann, D. und Kehlen, A., Langner, J., Characterization of the immunophenotype and functional properties of fibroblast-like synoviocytes in comparison to skin fibroblasts and umbilical vein endothelial cells. *Immunobiology.* 1994. 190(1-2): 67–92.

- 89 Nilsen, E. M., Johansen, F. E. und Jahnsen, F. L., Lundin, K. E., Scholz, T., Brandtzaeg, P., Haraldsen, G., Cytokine profiles of cultured microvascular endothelial cells from the human intestine. *Gut*. 1998. 42(5): 635–642.
- 90 Hannan, R. L., Kourembanas, S. und Flanders, K. C., Rogelj, S. J., Roberts, A. B., Faller, D. V., Klagsbrun, M., Endothelial cells synthesize basic fibroblast growth factor and transforming growth factor beta. *Growth Factors*. 1988. 1(1): 7–17.
- 91 Xu, W., Roos, A. und Schlagwein, N., Woltman, A. M., Daha, M. R., van Kooten, C., IL-10-producing macrophages preferentially clear early apoptotic cells. *Blood*. 2006. 107(12): 4930–4937.
- 92 Saijo, S., Nagata, K. und Masuda, J., Matsumoto, I., Kobayashi, Y., Discrimination of early and late apoptotic cells by NBD-phosphatidylserine-labelling and time-lapse observation of phagocytosis of apoptotic cells by macrophages. *J. Biochem*. 2007. 141(3): 301–307.
- 93 Lindner, H., Holler, E. und Ertl, B., Multhoff, G., Schreglmann, M., Klauke, I., Schultz-Hector, S., Eissner, G., Peripheral blood mononuclear cells induce programmed cell death in human endothelial cells and may prevent repair: role of cytokines. *Blood*. 1997. 89(6): 1931–1938.
- 94 Linssen, J., Aderhold, S. und Nierhaus, A., Frings, D., Kaltschmidt, C., Zänker, K., Automation and validation of a rapid method to assess neutrophil and monocyte activation by routine fluorescence flow cytometry in vitro. *Cytometry B Clin Cytom*. 2008. 74(5): 295–309.
- 95 Chen, W., Frank, M. E. und Jin, W., Wahl, S. M., TGF-beta released by apoptotic T cells contributes to an immunosuppressive milieu. *Immunity*. 2001. 14(6): 715–725.
- 96 Cu, A., Ye, Q. und Sarria, R., Nakamura, S., Guzman, J., Costabel, U., N-acetylcysteine inhibits TNF-alpha, sTNFR, and TGF-beta1 release by alveolar macrophages in idiopathic pulmonary fibrosis in vitro. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis*. 2009. 26(2): 147–154.
- 97 Yum, H. Y., Cho, J. Y. und Miller, M., Broide, D. H., Allergen-induced coexpression of bFGF and TGF- β 1 by macrophages in a mouse model of airway remodeling: bFGF induces macrophage TGF- β 1 expression in vitro. *Int. Arch. Allergy Immunol*. 2011. 155(1): 12–22.
- 98 Yamazaki, T., Nagata, K. und Kobayashi, Y., Cytokine production by M-CSF- and GM-CSF-induced mouse bone marrow-derived macrophages upon coculturing with late apoptotic cells. *Cell. Immunol*. 2008. 251(2): 124–130.
- 99 Breuckmann, F., Kobyletzki, G. von und Avermaete, A., Radenhausen, M., Höxtermann, S., Pieck, C., Schöneborn, P. et al., Mechanisms of apoptosis: UVA1-induced immediate and UVB-induced delayed apoptosis in human T cells in vitro. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2003. 17(4): 418–429.

- 100Bogdándi, E. N., Balogh, A. und Felgyinszki, N., Szatmári, T., Persa, E., Hildebrandt, G., Sáfrány, G., Lumniczky, K., Effects of low-dose radiation on the immune system of mice after total-body irradiation. *Radiat. Res.* 2010. 174(4): 480–489.
- 101Ootsuyama, A., Okazaki, R. und Norimura, T., Effect of extended exposure to low-dose radiation on autoimmune diseases of immunologically suppressed MRL/MpTn-gld/gld mice. *J. Radiat. Res.* 2003. 44(3): 243–247.
- 102Cui, Y. F., Gao, Y. B. und Yang, H., Xiong, C. Q., Xia, G. W., Wang, D. W., Apoptosis of circulating lymphocytes induced by whole body gamma-irradiation and its mechanism. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 1999. 18(3): 185–189.
- 103Gridley, D. S., Pecaut, M. J. und Nelson, G. A., Total-body irradiation with high-LET particles: acute and chronic effects on the immune system. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2002. 282(3): R677-88.
- 104Shehata, M., Schwarzmeier, J. D. und Hilgarth, M., Demirtas, D., Richter, D., Hubmann, R., Boeck, P. *et al.*, Effect of combined spa-exercise therapy on circulating TGF-beta1 levels in patients with ankylosing spondylitis. *Wien. Klin. Wochenschr.* 2006. 118(9-10): 266–272.

Abkürzungsverzeichnis

Bq	Becquerel
BCR	<u>B</u> - <u>c</u> ell antigen <u>r</u> eceptor (B-Zell Antigenrezeptor)
DNA	<u>D</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid (Desoxyribonukleinsäure)
EGF	<u>E</u> ndothelial <u>g</u> rowth <u>f</u> actor (Endothelialer Wachstumsfaktor)
eV	<u>E</u> lektronen <u>V</u> olt
FGF	<u>F</u> ibroblast <u>g</u> rowth <u>f</u> actor (Fibroblasten Wachstumsfaktor)
GM-CSF	Granulocyte/Monocyte colony stimulating factor
HIMEC	<u>H</u> uman <u>i</u> ntestinal <u>m</u> icrovasc <u>u</u> lar <u>e</u> ndothelial <u>c</u> ells
HMVEC	<u>H</u> uman <u>m</u> icrovascular <u>v</u> ein <u>e</u> ndothelial <u>c</u> ells
HPAEC	<u>H</u> uman <u>p</u> ulmonary <u>a</u> orta <u>e</u> ndothelial <u>c</u> ells
HUVEC	<u>H</u> uman <u>u</u> mbilic <u>a</u> l <u>v</u> ein <u>e</u> ndothelial <u>c</u> ells
ICAM	<u>I</u> ntra <u>c</u> ellular <u>a</u> dhesion <u>m</u> olecule (intrazelluläres Adhäsionsmolekül)

IL	Interleukin
IR	Ionizing radiation (Ionisierende Strahlung)
iv	Intravenös
LAP	Latency associated Protein
LET	<u>L</u> inearer <u>E</u> nergie <u>t</u> ransfer
LPS	<u>L</u> ipopolysaccharid
MCP-1	Makrophagen-Chemoattraktorprotein-1
M-CSF	Monocyte colony stimulating factor
NK	<u>N</u> atürliche- <u>K</u> illerzellen
NO	<u>N</u> itric <u>o</u> xide (Stickoxid)
PAF	<u>P</u> latelet <u>a</u> ctivating <u>f</u> actor (plättchenaktivierender Faktor)
PBL	<u>P</u> eriphere <u>B</u> lut- <u>L</u> ymphozyten
PBMC	<u>P</u> eripheral <u>b</u> lood <u>m</u> ononuclear <u>c</u> ells
RBW	<u>R</u> elative <u>b</u> iologische <u>W</u> irksamkeit
STS	Staurosporin
TCR	<u>T</u> - <u>c</u> ell antigen <u>r</u> eceptor (T-Zell Antigenrezeptor)
TGF-β	<u>T</u> ransforming-growth- <u>f</u> actor-β
T_H	<u>T</u> - <u>H</u> elfer Zellen
TLR	<u>T</u> oll- <u>l</u> ike <u>r</u> eceptor
TNF-α	<u>T</u> umor- <u>N</u> ekrose- <u>F</u> aktor-α
TSP-1	Thrombospondin-1
UV	<u>U</u> ltraviolett
W_R	Strahlungswichtungsfaktor

Wertetabellen

Wertetabelle zu Abb. 22

Annexin										TUNEL					
24 Stunden															
Dose [Gy]	Röntgen	SD	SEM	N	n	Stickstoff	SD	N	n	Kohlenstoff	SD	SEM	N	n	
0	6,30	0,89	0,45	2	4	-									
0,5	16,02	0,08		1	2	7,17	0,98	1	2	13,04	2,72	1,57	1	3	
1,5	-					15,03	1,68	1	2	16,42	1,40	0,81	1	3	
2	25,64	0,40		1	2	-				25,34	6,06	3,50	1	3	
6	34,83	0,23		1	2	-									
72 Stunden															
0	11,34	3,27	1,09	4	9	-									
0,5	41,43	15,71	5,94	3	7	44,06	4,77	1	2	37,71	3,24	1,87	1	3	
1,5	-					68,19	2,26	1	2	53,82	3,46	2,00	1	3	
2	56,63	1,99		1	2	-				70,88	5,29	3,06	1	3	
6	84,60	9,04	4,52	2	4	-									
12	87,52	0,70	0,41	1	3										

Wertetabelle zu Abb. 23

Dose [Gy]	MW	SD	MW	SD	N	n
	-TGF-β		+TGF-β			
0	10,30	0,23	9,29	2,32	1	2
0,5	27,40	0,61	25,82	3,89	1	2
6	77,12	4,56	79,82	9,38	1	2
	-TNF-α		+TNF-α			
0	13,03	1,84	19,90	0,21	1	2
0,5	62,95	6,17	74,25	1,00	1	2
6	92,08	0,84	94,88	0,02	1	2
	-LPS		+LPS			
0	11,60	2,56	12,58	1,02	2	4
0,5	40,25	2,56	36,62	2,67	2	4
2	69,80	1,26	66,36	5,69	2	4

Wertetabelle zu Abb.24+25

Dosis [Gy]	Monozyten				Makrophagen			
	MW	SD/SEM	N	n	MW	SD/SEM	N	n
0	1,00	0,34	2	4	1,79	0,51	2	5
0,5	1,56	0,61	2	5	1,83	0,37	2	5
2	1,24	0,06	1	2	1,60	0,66	1	2
6	1,24	0,48	2	5	0,77	0,28	1	3
12	0,49	0,17	1	3				

Wertetabelle zu Abb. 26 (N=1, n=2)

Strahlung	Dosis [Gy]	MW	Gezählte Zellen
Röntgen	0	2,15	1162
	1,5	2,42	869
	12	2,65	678
Lithium	0	10,34	58
	0,5	9,01	111
	2	24,83	145

Wertetabelle zu Abb.27 (N=1, n=2)

Dosis [Gy]	Stimulation	MW	SD
0	unst.	76,38	12,93
0	+TNF- α	100,00	6,04
0,1		110,44	11,91
0,3		111,82	15,56
0,5		105,38	8,59
1		106,89	6,40
2		134,65	25,28

Wertetabelle zu Abb. 28 (SEM: N=2-9, n=4-19; SD: N=1, n=2)

Zeit [Tagen]	1		5		7		8	
Dosis [Gy]	MW	SEM	MW	SD	MW	SD	MW	SD
	-TNF- α							
0	44,31	8,03	7,33	3,60	20,31	2,89	11,17	3,00
	+TNF- α							
0	100,00	0,00	100,00	1,63	100,00	6,67	100,00	0,22
0,5	103,86	4,52	96,71	3,81	94,64	6,14	104,52	10,84
6	130,95	22,14	111,07	0,00	124,08	0,19	144,82	4,33

Wertetabelle zu Abb. 29

Probe	MW	SD	SEM	N	n
0Gy -TNF- α	27,64	31,01	15,51	2	4
0Gy +TNF- α	100,00	0,00	0,00	2	4
0.5Gy +TNF- α	19,23	19,89	8,12	2	6
6Gy +TNF- α	58,57	11,14		1	2

Wertetabelle zu Abb. 30

	Röntgen					Kohlenstoff				Stickstoff			
Zelltyp	Dosis [Gy]	MW	SD/SEM	N	n	MW	SD	N	n	MW	SD	N	n
EA-hy.926	0	1,00	0,00	2	6	1,00	0,00	1	2	-			
	0,1	-				1,00	0,05	1	2				
	0,5	0,98	0,11	2	6	1,29	0,02	1	2				
	1,2	-				0,92	0,20	1	2				
	2					2,23	0,03	1	2				
	6	1,41	0,05	1	3	-							
HUVEC	0	1,00	0,00	4	10	1,00	0,00	1	2	1,00	0,00	1	2
	0,1	-				1,55	0,04	1	2	1,19	0,06	1	2
	0,5	1,58	0,25	2	5	2,03	0,03	1	2	1,22	0,25	1	2
	2	-				1,80	0,04	1	2	1,33	0,00	1	1
	6	1,88	0,24	3	8	-				-			
HMVEC	0	1,00	0,00	2	5	1,00	0,16	1	2	-			
	0,1	-				0,75	0,36	1	2				
	0,5	0,88	0,13	2	5	0,94	0,34	1	2				
	2	0,94	0,17	2	5	0,76	0,18	1	2				
	6	1,00	0,13	2	5	-							
HPAEC	0	1,00	0,00	2	6	-				-			
	0,5	1,02	0,01	2	6								
	2	0,93	0,02	2	6								
	6	1,19	0,01	2	6								

Wertetabelle zu Abb. 31 (N=3, n=11; ¹N=4, n=15)

Subtyp	unst.		M-CSF ¹		GM-CSF	
Co-Kultur	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
unb. PBL	1,00	0,07	0,80	0,05	0,64	0,13
apop. PBL	1,09	0,09	1,06	0,08	0,84	0,20

Wertetabelle zu Abb. 32 (N=1, n=2)

Strahlung	Röntgen		Kohlenstoff	
Co-Kultur	MW	SD	MW	SD
unb. PBL	1,00	0,24	1,00	0,05
apop. PBL 0,5Gy	-		1,18	0,03
apop. PBL 2Gy			1,51	0,36
apop. PBL 6Gy	2,41	0,43	-	

Wertetabelle zu Abb. 33 A+B

Zytokin	Strahlung	Röntgen -LPS				Röntgen +LPS				Kohlenstoff -LPS			
	Dosis [Gy]	MW	SD/SEM	N	n	MW	SD	N	n	MW	SD	N	n
TGF- β	0	1,00	0,35	3	7	0,72	0,04	1	3	1,00	0,03	1	2
	0,1	1,07	0,30	1	2	-				1,19	0,05	1	2
	0,5	0,59	0,19	2	5	0,50	0,19	1	3	0,90	0,04	1	2
	2	-				-				0,45	0,03	1	2
	6	0,61	0,14	2	5	0,48	0,04	1	3	-			
TNF- α	0	1,00	0,85	3	7	152,22	4,54	1	3	1,00	0,11	1	2
	0,1	-				-				1,25	0,05	1	2
	0,5	1,19	1,06	2	5	164,22	7,52	1	3	1,08	0,07	1	2
	2	-				-				1,34	0,11	1	2
	6	3,98	3,56	2	5	165,80	3,83	1	3	-			

Wertetabelle zu Abb. 34 A+B (N=2, n=4; ¹N=1, n=2)

Strahlung	Subtyp	Unst.		M-CSF		GM-CSF	
Röntgen	Dosis [Gy]	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
	0	1,00	0,21	0,95	0,09	7,40	1,53
	0,5	0,49	0,07	0,79	0,08	5,93	1,17
	6	0,44	0,11	0,88	0,17	7,51	2,12
Kohlenstoff ¹	Dosis [Gy]	MW	SD	MW	SD	MW	SD
	0	1,00	0,07	1,57	0,51	5,67	0,91
	0,1	2,23	0,78	1,67	0,19	8,58	0,62
	0,5	2,29	0,68	1,92	0,18	5,17	0,71
	2	2,05	0,02	1,63	0,09	4,81	0,90

Wertetabelle zu Abb. 35 A+B (N=2, n=4; ¹N=1, n=2)

Strahlung	Subtyp	Unst.		M-CSF		GM-CSF	
Röntgen	Dosis [Gy]	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
	0	1,00	0,58	1,15	0,31	2,50	0,48
	0,5	1,04	0,60	1,43	0,48	3,16	0,73
	6	1,03	0,60	1,17	0,36	3,10	0,27
Kohlenstoff ¹	Dosis [Gy]	MW	SD	MW	SD	MW	SD
	0	1,00	0,20	1,38	0,34	3,63	0,11
	0,1	1,52	0,07	1,41	0,01	2,56	0,74
	0,25/0,5	1,11	0,02	1,42	0,06	1,56	0,17
	2	1,43	0,14	1,59	0,19	2,55	1,09

Wertetabelle zu Abb. 36 A+B

Strahlung	Subtyp	unst.			M-CSF			GM-CSF		
	Dosis [Gy]	MW	SD	N(n)	MW	SD	N(n)	MW	SD/SEM	N(n)
Röntgen	0	1,00	0,13	1(2)	0,83	0,19	1(3)	0,24	0,16	2(4)
	0,5	0,99	0,56	1(3)	1,06	0,17	1(3)	0,26	0,20	2(5)
	6	1,32	0,08	1(2)	0,88	0,12	1(3)	0,33	0,00	1(2)
Kohlenstoff	0	1,00	0,05	1(2)	1,67	0,28	1(2)	0,77	0,14	1(2)
	0,1	4,43	0,36	1(2)	2,53	0,48	1(2)	1,71	1,27	1(2)
	0,5	3,49	0,95	1(2)	2,31	0,29	1(2)	0,49	0,12	1(2)
	2	2,65	0,65	1(2)	6,22	1,81	1(2)	1,19	0,92	1(2)

Wertetabelle zu Abb. 37 A+B

Strahlung	Stunden	6				24				48			
	Dosis [Gy]	MW	SD	N	n	MW	SD/SEM	N	n	MW	SD/SEM	N	n
Röntgen	0	-				1,00	0,27	2	4	-			
	0,5					0,89	0,19	2	3				
	2					1,01	0,01	1	2				
	6					0,92	0,21	2	4				
Stickstoff	0	1,00	0,17	1	2	0,70	0,00	1	2	0,50	0,01	1	2
	0,1	0,45	0,15	1	2	0,59	0,09	1	2	0,36	0,00	1	2
	0,5	0,93	0,02	1	2	0,81	0,18	1	2	0,51	0,00	1	2
	1,5	2,05	0,35	1	2	1,06	0,02	1	2	0,79	0,01	1	2

Wertetabelle zu Abb. 38 A+B

Stimulierung	Subtyp	Unst.			M-CSF			GM-CSF		
	Co-Kultur	MW	SEM	N(n)	MW	SEM	N(n)	MW	SEM	N(n)
-LPS	Mono	1,00	0,30	3(7)	0,73	0,14	5(11)	1,32	0,29	3(7)
	unbstr. PBL	0,99	0,13	3(7)	0,85	0,16	5(11)	1,60	0,55	3(7)
	apoptot. PBL 6Gy	0,95	0,17	3(7)	0,83	0,19	5(11)	1,37	0,37	3(7)
+LPS	Mono	0,55	0,28	2(4)	0,57	0,14	4(8)	1,48	0,54	2(4)
	unbstr. PBL	0,93	0,36	2(4)	0,93	0,32	4(8)	2,10	0,82	2(4)
	apoptot. PBL 6Gy	1,28	0,40	2(4)	0,85	0,31	4(8)	1,98	0,83	2(4)

Wertetabelle zu Abb. 39 A+B

Stimulierung	Subtyp	Unst.			M-CSF			GM-CSF		
	Co-Kultur	MW	SEM	N(n)	MW	SEM	N(n)	MW	SEM	N(n)
-LPS	Mono	0,01	0,01	3(6)	0,06	0,03	5(11)	1,00	0,30	3(7)
	unbstr. PBL	1,71	0,82	3(7)	1,78	0,88	5(9)	5,04	2,68	3(6)
	apoptot. PBL 6Gy	0,91	0,57	3(7)	1,38	0,59	5(11)	0,96	0,39	3(7)
	PFA PBL	-			0,11	0,00	1(2)	-		
+LPS	Mono	37,53	10,46	2(4)	24,36	6,62	4(8)	44,07	6,57	2(4)
	unbstr. PBL	40,91	7,25	2(4)	30,19	5,43	4(8)	39,91	4,02	2(4)
	apoptot. PBL 6Gy	41,19	7,37	2(4)	37,11	2,83	4(8)	41,43	4,99	2(4)

Wertetabelle zu Abb. 40 A+B (N=2, n=4)

Stimulierung	Zytokin	TGF- β		TNF- α	
	Co-Kultur	MW	SEM	MW	SEM
-LPS	Mono	1,00	0,05	1,00	0,26
	unbstr. PBL	1,15	0,13	2,58	0,53
	apop. PBL 0,5Gy	1,31	0,12	1,22	0,24
	apop. PBL 2Gy	0,97	0,06	1,2915	0,2662
+LPS	Mono	1,09	0,12	545,07	112,75
	unbstr. PBL	1,13	0,07	533,12	100,96
	apop. PBL 0,5Gy	1,16	0,08	569,76	134,50
	apop. PBL 2Gy	1,03	0,04	602,33	114,9

Wertetabelle zu Abb. 41 A+B

Stimulierung	Subtyp	Unst.			M-CSF			GM-CSF		
	Co-Kultur	MW	SEM	N(n)	MW	SEM	N(n)	MW	SEM	N(n)
-LPS	Mono	1,00	0,42	3(7)	1,45	0,36	10(21)	0,03	0,02	2(5)
	unbstr. PBL (1)	1,28	0,25	3(7)	2,34	0,53	5(11)	1,60	1,15	2(5)
	apop. PBL 6Gy (1)	1,24	0,33	3(7)	1,83	0,47	3(7)	0,06	0,04	2(5)
	unbstr. PBL (2)	-			23,63	9,86	2(4)	-		
	apop. PBL 6Gy (2)				31,42	3,98	2(4)			
	PFA PBL				4,82	0,20	1(2)			
+LPS	Mono	28,45	7,27	1(2)	57,52	6,70	5(12)	7,63	0,04	1(2)
	unbstr. PBL	31,26	0,84	1(2)	55,04	6,04	4(12)	7,07	1,41	1(2)
	apoptot. PBL 6Gy	29,20	0,86	1(2)	45,40	7,30	4(8)	7,75	0,02	1(2)

Wertetabelle zu Abb. 42 A+B (N=1, n=2)

Spender	Stimulation	-LPS		+LPS	
	Co-Kultur	MW	SD	MW	SD
1	mono.	0,00	0,00	416,22	0,86
	unb.	2,34	1,87	415,76	3,55
	apop 0,5Gy	2,02	2,86	417,74	3,32
	apop. 2Gy	1,44	2,03	413,27	1,81
2	mono.	1,00	1,41	403,18	1,94
	unb.	21,51	5,74	405,97	6,61
	apop 0,5Gy	4,65	1,84	404,36	3,68
	apop. 2Gy	2,79	3,94	408,53	6,15

Wertetabelle zu Abb. 43 A+B (N=2, n=4)

Strahlung	Stimulation	-TNF- α		+TNF- α	
	Co-Kultur	MW	SEM	MW	SEM
Röntgen	mono.	1,00	0,11	0,71	0,18
	unb.	0,97	0,17	1,26	0,09
	apop 6Gy	1,10	0,10	1,01	0,23
	unb. 7Tage	0,94	0,22	1,24	0,24
Kohlenstoff	mono.	1,00	0,16	0,81	0,11
	unb.	1,24	0,04	0,86	0,13
	apop 0,5Gy	1,13	0,08	0,92	0,04
	apop 2Gy	0,88	0,15	0,90	0,03

Wertetabelle zu Abb. 44 A+B (N=2, n=4)

Strahlung	Stimulation	-TNF- α		+TNF- α	
	Co-Kultur	MW	SEM	MW	SEM
Röntgen	mono.	1,00	0,14	9,09	0,71
	unb.	1,11	0,09	9,77	0,76
	apop 6Gy	1,08	0,17	12,27	2,10
	unb. 7Tage	10,32	1,87	10,67	0,92
Kohlenstoff	mono.	1,00	0,11	4,49	0,35
	unb.	1,15	0,11	5,09	0,37
	apop 0,5Gy	1,22	0,06	5,03	0,35
	apop 2Gy	1,09	0,08	3,50	0,19

Wertetabelle zu Abb. 45 (N=2, n=4)

Zytokin	TGF- β		TNF- α		IL-10	
Co-Kultur	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
mono	1,00	0,10	1,00	0,28	1,00	0,13
unb.	0,90	0,14	1,82	0,37	1,00	0,08
apop. UV-B	0,59	0,07	1,54	0,84	6,45	0,26
apop. X-ray	0,62	0,03	1,15	0,32	0,70	0,21

Wertetabelle zu Abb. 46

Einfahrten	0	2	3	5
Quotient	1,00	0,81	0,32	1,05
	1,60		0,50	1,06
	0,99		0,57	1,36
	0,72	-	0,70	1,37
	-		0,76	1,60

Wertetabelle zu Abb. 47-50

Experiment	Zytokinkonzentration												
	Zytokine	TGF-β [ng/ml]			TNF-α [pg/ml]			IL-10 [pg/ml]			M-CSF [pg/ml]		
	Probe	VT	WT	NT	VT	WT	NT	VT	WT	NT	VT	WT	NT
1	Patient	6,4	8,7	2,5	139,6	158,3	121,7	3,5	10,8	5,7	0,0	172,7	9,9
2	Personal	8,9	-	5,5	0,0	-	0,0	2,6	-	0,0	0,0	-	0,0
		3,9		3,3	0,0		0,0	0,0		3,5	0,0		
		13,9		10,8	0,0		0,0	8,5		8,7	0,0		
		13,0		11,5	0,0		0,0	5,6		3,7	0,0		
		4,2		10,1	51,2		43,7	0,0		8,7	0,0		
	Patienten	2,8	-	3,7	0,0	-	0,0	0,0	-	0,0	0,0	-	0,0
		2,9		3,6	0,0		0,0	0,0		0,8	0,0		
		5,3		6,0	404,9		346,2	8,7		10,8	8,8		
		3,3		3,8	0,0		0,0	11,5		1,0	79,7		
		3,7		2,8	0,0		0,0	0,0		2,5	0,0		
		3,2		3,4	0,0		0,0	2,8		0,0	0,0		
		6,1		5,5	0,0		0,0	16,2		7,0	0,0		
		22,6		12,6	0,0		0,0	7,9		8,3	0,0		
		14,8		20,3	0,0		0,0	7,1		20,8	0,0		
		15,5		20,7	0,0		0,0	0,0		0,2	0,0		
		14,1		24,8	0,0		0,0	6,5		3,6	0,0		
		11,3		17,5	0,0		0,0	0,8		8,4	0,0		

Chemikalienliste

Bezeichnung	Hersteller/Firma	Artikelnummer
Accutase	PAA	L11-007
Ammoniumchlorid	Roth	K298.1
Annexin-V Kit	Miltenyi	130-092-052
Annexin-V-Fluos Kit	Roche	11858777001
Annexin-V-FLUOS Staining Kit	Roche	11858777001
anti CD-14 FITC	Miltenyi	130-080-701
anti CD19 APC	R&D-Systems	FAB4867A
anti CD3e PE	R&D-Systems	FAB100P
anti CD68 PE	R&D-Systems	IC20401P
anti-hTGF β -IgA,	Invivo Gen	maba-htgfb
Biocoll 1,077g/ml	Biochrom	L6115
Biotin N-hydroxysuccinimide ester	Sigma	H1759-5MG
bisBenzimide H 33342 trihydrochloride	Sigma	14533
BSA (Albumin, Bovine)	Sigma	A-2153
CASY ton	Roche Diagnostics	05651808001
DMEM mit Glutamin	Biochrom	FG0445
EDTA	Sigma	ED2SS
EGM Bullet Kit	Lonza	CC-3124
EGM-2 MV Bullet Kit	Lonza	CC-3202
ELISA DuoSet hTGF- β	R&D Systems	DY240
ELISA DuoSet hTNF- α	R&D Systems	DY210
Ethanol	Roth	K928.4
FcR Blocking Reagent,	Miltenyi	130-059-901
FCS	Biochrom	S0615
Griess Reagenz	Sigma	G4410
HEPES (1M)	Biochrom	L1613
HMVEC-d	Lonza	CC-2543
HPAEC	Lonza	CC-2923
human GM-CSF	Miltenyi Biotec	130-093-865
human M-CSF	Miltenyi Biotec	130-093-963

Bezeichnung	Hersteller/Firma	Artikelnummer
Human TGF beta1 ELISA Ready-SET-Go!	eBiosciences	88-8350-86
human TGF- β	R&D Systems	240-B
human TNF- α	R&D Systems	210-TA
HUVEC	Lonza	CC-2519
IgA2 Isotype Control	Invivo Gen	maba2-ctrl
IL-10 ELISA Ready-SET-Go!	eBiosciences	88-7106-86
In Situ Cell Death Detection Kit	Roche	11 684 795 001
LPS	Sigma	L4516
Mouse IgG2a Isotype	Miltenyi	130-094-671
Mouse Isotype IgG1 PE	R&D-Systems	IC002P
Natriumpyruvat	Biochrom	L0473
Paraformaldehyd	Merck	1.03999.1000
PBS mit $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$	Biochrom	L1815
PBS w/o $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$	Biochrom	L182-01
PBS-Trockensubstanz ohne $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$	Biochrom	L182-01
Penicillin/Streptomycin	Biochrom	A2213
PKH67 Cell Linker Kit	Sigma	MIDI67-1KT
RPMI 1640	Biochrom	FG1215
Schwefelsäure	LS Labor-Service GmbH	2740.1000
Streptavidin-Cy3	Sigma	S6402
Streptavidin-FITC	Sigma	S3762
Tris	AppliChem	A1086,1000
Trypanblau 0,4%	Sigma	T8154
Trypsin/EDTA	PAN Biotech GmbH	P10-023500
Tween20	AppliChem	A4974,0100
Vectashield-Mounting Medium	Vector Laboratories Inc.	H-1000
X-Vivo 15	Lonza	BE04-418F

Lebenslauf

Persönliche Daten: Dipl. Ing. (FH) Jonas Klinger

Berufsleben:

Hochschulausbildung:

Seit 12/2008 Promotionsstudent an der TU-Darmstadt
Doktorand am Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung (GSI), Darmstadt
Titel der Dissertation: *Entzündungshemmende Effekte von ionisierender Strahlung im Niedrig-Dosisbereich, untersucht in Co-Kultur Systemen humaner Endothelzellen und Leukozyten*
Stipendiat der *Helmholtz Graduate School for Hadron and Ion Research*

09/2001-07/2006 Studium der Biotechnologie an der Hochschule Darmstadt
Titel der Diplomarbeit: *Durchflusszytometrischer Nachweis von γ H2AX Signalen in UVA-exponierten humanen Fibroblastenzelllinien*
Abschluss des Diploms, Note: 2,0

Schulbildung:

1997-2000 Abschluss des Abiturs, Note: 1,8

Ehrenwörtliche Erklärung:

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommene Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und noch nicht veröffentlicht.

Darmstadt, den 02.03.2012

.....